Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Vergleichende Untersuchung der Gallensäuren DC, CDC, UDC und TC bezüglich ihrer Wirkung auf isolierte Hepatozyten und perfundierte Rattenleber

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Tobias Rogg
aus Ulm

1983

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. L. Koslowski

Vergleichende Untersuchung der Gallensäuren DC, CDC, UDC und TC bezüglich ihrer Wirkung auf isolierte Hepatozyten und perfundierte Rattenleber

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
Tobias Rogg
aus Ulm

1983

Dekan:	Professor Dr. W. Frommhold
1. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. Dr. K. Schmidt
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. W. Heitland

UNIV. LEIDEN BIBL.

REFO-DRUCK HANS VOGLER TÜBINGEN

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Allgemeiner Teil	3
2.1.	Die Gallensäuren	3
2.1.1.	Chemie der Gallensäuren	3
2.1.2.	Synthese der Gallensäuren	5
2.1.3.	Der enterohepatische Kreislauf	5
2.1.4.	Funktion der Gallensäuren	6
2.1.5.	Allgemeine Bemerkungen zu Mizellen	7
2.1.6.	Spezielle Eigenschaften von Gallensäuremizellen	8
2.2.	Auswahl der verwendeten Gallensäuren	9
2.3.	Auswahl der verwendeten Testsysteme	10
3.	Materialien	13
4.	Methoden	15
4.1.	Bestimmung der Enzymaktivität	15
4.2.	Hepatozytenisolierung	15
4.2.1.	Operation und Vorperfusion	15
4.2.2.	Medium für die Vorperfusion	17
4.2.3.	Perfusion mit Collagenase	17
4.3.	Vitalitätstest (isolierte Hepatozyten)	20
4.3.1.	Anfärbbarkeit mit Trypanblau	20
4.3.2.	Atmungsstimulation mit Succinat	20
4.4.	Inkubation der isolierten Hepatozyten mit Gallensäuren	21
4.5.	Proteinbestimmung	21
4.6.	Leberperfusion mit Gallensäuren	22
4.7.	Statistik	24
5.	Ergebnisse	25
5.1.	Hepatozyteninkubation mit CDC und DC	25
5.2.	Leberperfusion	29
5.2.1.	Leberperfusion mit DC,CDC,UDC und TC	29
5.2.2.	Langzeitperfusion ohne Gallensäuren	37
6.	Diskussion	38

		Seite
6.1.	Zur Methode der Messung des Enzymaustritts als Indikator für eine Membranschädigung	38
6.2.1.	Wirkungsmechanismus der Membranschädigung	42
6.2.2.	Zur Methode der Inkubation mit isolierten Zellen	43
6.3.1.	Leberperfusion	44
6.3.2.	CDC- bzw. UDC-Gallensteintherapie	45
6.3.3.	Perfusion mit CDC bzw. UDC	48
6.3.4.	Perfusion mit DC	49
6.3.5.	Perfusion mit TC	50
6.3.6.	Beziehung zwischen dem Wirkungsmechanismus der Zellschädigung und der Struktur der verwendeten Gallensäuren	50
6.3.7.	Zur Methode der Perfusion	53
6.3.8.	Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Versuchen mit isolierten Hepatozyten und perfundierten Rattenlebern auf die Verhältnisse in vivo	55
7.	Zusammenfassung	58
8.	Tabellarischer Anhang	59
9.	Literaturverzeichnis	65

Verzeichnis der Abkürzungen

ATP	: Adenosintriphosphat
CDC	: Chenodesoxycholsäure
CMC	: kritische mizellare Konzentration
CMT	: kritische mizellare Temperatur
DC	: Desoxycholsäure
EGTA	: Äthylenglykol-bis-(2-aminoäthyl)-tetraessigsäure
GOT	: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase EC 2.6.1.1
HMG-CoA	: ß-Hydroxy-ß-methyl-glutaryl-Coenzym A
LC	: Lithocholsäure
LDH	: Lactat-Dehydrogenase EC 1.1.1.27
SEM	: Standardfehler des Mittelwertes
TC	: Taurocholsäure
UDC	: Ursodesoxycholsäure
U/l	: Units pro Liter

1. EINLEITUNG

Die Funktion und Verteilung der Gallensäuren im Körper waren lange Zeit ungeklärt,und erst gegen Ende des letzten Jahrhunderts gelangte man zu der Auffassung,dass die Gallensäuren in der Galle als Lösungsmittel für Lezithin und Cholesterin fungieren und so bei der Exkretion von wasserunlöslichen endogenen Lipiden mitwirken (33).

Mit der Strukturaufklärung der Gallensäuren,die gleichzeitig mit der des Cholesterins erfolgte,setzte eine intensive Erforschung ihrer Funktion ein (86):G.S. Hartley (26) beschrieb 1936 als erster die amphipathische Struktur der Gallensäuren,die unter bestimmten Bedingungen in wässrigen Lösungen zu Mizellenbildung führt.Die Arbeiten von Roepke und Mason 1940 (65) und McBain et al. 1941 (53) bestätigten diese Ergebnisse und waren die ersten einer Flut von Veröffentlichungen,die sich mit den mizellaren Eigenschaften der Gallensäuren befassten.

Die Gallensäuren sind der Wissenschaft schon seit Mitte des vorigen Jahrhunderts bekannt,jedoch erst 1956 wurde ihre hepatotoxische Wirkung entdeckt:Holsti (30) beobachtete bei der Verfütterung von Ochsengalle an Kaninchen nach einiger Zeit die Entwicklung einer Leberzirrhose, was er auf die Einwirkung von Lithocholsäure zurückführte.

Zahlreiche Autoren beschrieben seither die Auswirkungen verschiedener Gallensäuren auf die Morphologie des Leberparenchyms (15,17,44,62).Zu diesem Zweck wurden die zu untersuchenden Gallensäuren den Versuchstieren entweder oral verabreicht (20,30,38,44) oder sie wurden intravenös infundiert (56).Dabei wurden je nach Art und Menge der verwendeten Gallensäure Veränderungen wie Dilatation der Canaliculi,Rarefizierung der Mikrovilli,Hyperplasie des Golgiapparates und Vermehrung des glatten endoplasmatischen Reticulums beobachtet (15,17,44,62).Bedingt durch den relativ komplizierten Versuchsaufbau und die Verstoffwechselung der Gallensäuren war es bis jetzt noch

nicht möglich,anzugeben,worauf der Schädigungsmechanismus der verschiedenen Gallensäuren beruht.

Deswegen wurde bei der vorliegenden Untersuchung verschiedener Gallensäuren von relativ einfachen Modellen ausgegangen,um die Zahl der die Interpretation der Ergebnisse erschwerenden Faktoren möglichst gering zu halten.

C. Rodloff untersuchte die Auswirkungen der Gallensäuren auf isolierte Zellenzyme (64) und stellte fest,dass sowohl die verwendeten Gallensäuren als auch das verwendete Enzym eine Rolle bei den Wechselwirkungen zwischen Enzym und Gallensäure spielen.

Die Ergebnisse der oben erwähnten Untersuchungen warfen die Frage auf,ob der Angriffspunkt der Gallensäuren nicht eher an membranösen Zellstrukturen als an Zellenzymen zu suchen sei.Eine in diesem Zusammenhang interessante Arbeit ist die vergleichende Untersuchung der hämolytischen Eigenschaften verschiedener Gallensäuren durch Berliner und Schoenheimer (5) ,die eine Abhängigkeit der hämolytischen Wirkung von der A-B-Konfiguration des Steroidkerns der Gallensäuren entdeckten.

In dieser Arbeit wurde nun untersucht,inwieweit die Ergebnisse von Berliner und Schoenheimer mit Erythrozyten auch auf Hepatozyten übertragbar waren.

2. ALLGEMEINER TEIL

2.1. Die Gallensäuren

2.1.1. Chemie der Gallensäuren

Die in der Galle als stark polare,an Glycin bzw. Taurin gekoppelte Anionen vorliegenden Gallensäuren gehören zur Gruppe der wasserlöslichen Lipide.Sie bestehen aus zwei kovalent verknüpften Anteilen mit gegensätzlichem Löslichkeitscharakter,d.h. mit einem hydrophoben und einem hydrophilen Anteil.

Die Gallensäuren sind Derivate des Cyclopentanoperhydrophenanthrens,die,wie u.a. auch Cholesterin,Digitalis und die Steroidhormone,zur Gruppe der Steroide gezählt werden,von denen sie sich jedoch durch ihre sterische Konfiguration unterscheiden:

Durch ihre cis-ständige Verknüpfung der Ringe A und B und eine trans-ständige Verknüpfung der Ringe B-C und C-D gehören sie zur 5-ß-Androstanreihe der Steroide.Am gesättigten Steroidkern befinden sich α-orientierte polare Hydroxylgruppen:am C_3- und C_7-Atom (Chenodesoxycholsäure), C_3- und C_{12}-Atom (Desoxycholsäure) oder am C_3-,C_7- und C_{12}-Atom (Cholsäure) (16).Die stark hydrophile Carboxylgruppe am C_{24}-Atom ist verantwortlich für den Säurecharakter der Gallensäuren.Diese stark polare Carboxylgruppe bedingt zusammen mit den Hydroxylgruppen die Wasserlöslichkeit der Gallensäuremoleküle.

Durch das Vorhandensein hydrophiler und hydrophober Bezirke an den Gallensäuremolekülen bekommen diese amphipathischen Charakter,d.h. sie sind sowohl in Wasser als auch in Öl löslich.Dies wird durch die perspektivische Darstellung in Abb.1 verdeutlicht:Die hydrophilen Gruppen ($-OH$,$-COO^-$) liegen unterhalb des Moleküläquators,und der hydrophobe Hauptteil des Steroidgerüstes mit seinen Methylgruppen liegt oberhalb des Äquators (8).Die polare Carboxylgruppe kann durch die Beweglichkeit der Seiten-

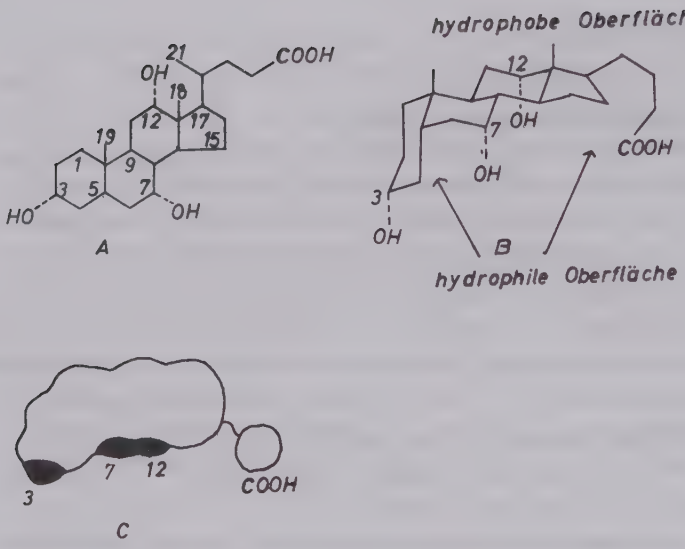


Abb.1: Cholsäure (3α-7α-12α-Trihydroxycholansäure)
A : konventionelle Strukturformel
B : perspektivische Strukturformel
C : vereinfachte Darstellung der räumlichen Anordnung der hydrophilen und hydrophoben Anteile

kette in derselben Ebene wie die OH-Gruppen zu liegen kommen und dadurch die Polarität der konvexen Molekülseite verstärken.Bedingt durch diese Struktur liegt das Gallensäuremonomer in einem Öl-Wasser-Gemisch an der Grenzfläche zwischen hydrophoben und hydrophilen Medium so, dass die konvexe Oberfläche des Steroidkerns mit dem lipophilen Medium und die polyhydroxylierte konkave Oberfläche mit dem wässrigen Medium in Berührung kommt (8).

Durch die Konjugierung der Gallensäure,d.h. die Carboxylgruppe der Seitenkette wird mit Taurin oder Glycin peptidisch verknüpft,erhöht sich die Polarität und damit die Wasserlöslichkeit des Moleküls.

2.1.2. Synthese der Gallensäuren

Die Gallensäuren werden ausschliesslich in den Hepatozyten aus Cholesterin unter Mitwirkung von mikrosomalen (Ring- und Seitenkettenhydroxilierung) und mitochondrialen (thiolytische Seitenkettenhydroxylierung) Enzymen gebildet (67,81).Das mikrosomale Enzym Cholesterin-7α-hydroxylase (EC 1.14.-.-) reguliert diese Synthese.

In der Leber werden unter physiologischen Bedingungen nur die zwei "primären" Gallensäuren Cholsäure (3α-7α-12α-Trihydroxy-5ß-Cholansäure) und Chenodesoxycholsäure (3α-7α-Dihydroxy-5ß-Cholansäure) synthetisiert.Diese primären Gallensäuren werden anschliessend im glatten endoplasmatischen Retikulum der Leberzelle unter Mitwirkung von ATP und Coenzym A an Glycin oder Taurin gekoppelt.

Im Darm entstehen aus den primären Gallensäuren durch einige streng anerobe Bakterienstämme die sekundären Gallensäuren Desoxycholsäure (3α-12α-Dihydroxy-5ß-Cholansäure) und Lithocholsäure (3α-Hydroxy-5ß-Cholansäure): Nach der Dekonjugierung werden die Hydroxylgruppen in der 7. oder 12. Position dehydriert oder in der 7. Position dehydroxyliert.Cholsäure wird so zu Desoxycholsäure, Chenodesoxycholsäure zu Lithocholsäure 7-α-hydroxyliert.

2.1.3. Der enterohepatische Kreislauf

Die Produktion der primären Gallensäuren in der Leber erfolgt kontinuierlich,und sie werden anschliessend in Mizellenform in die Gallencanaliculi sezerniert (67).

Tab.1: Lebergalle (67)

Wasser	95-98%
Gallensalze,total	0,65-1,4g%
Bilirubin	12-135mg%
Cholesterin	80-180mg%
Fettsäuren	160-410mg%
Proteine	140-270mg%

In der Gallenblase wird die Gallenflüssigkeit eingedickt und gespeichert.Nachdem die Gallensäuren durch das abführende Gallengangsystem in den Darm gelangt sind,werden sie dort zum grössten Teil in konjugierter Form im distalen Ileum rückresorbiert (67).Sie passieren die Darmwand und gelangen mit dem Pfortaderblut zurück zur Leber,wo die Hepatozyten die Gallensäuren mittels eines carrierabhängigen Prozesses sofort und nahezu vollständig aufnehmen.Täglich gehen aus diesem enterohepatischen Kreislauf ca. 100-300 mg mit den Faeces verloren, was der täglichen Syntheserate der Leber entspricht.Bei grossen Gallensäureverlusten,z.B. durch eine Gallenfistel, ist die Leber in der Lage,diese Syntheserate drastisch zu erhöhen.Dies erfolgt wahrscheinlich durch Induktion von Cholesterin-7α-hydroxylase infolge eines negativen Feedback-Mechanismus (29).

Der menschliche Gallensäurepool ist relativ klein (5-10 mmol = 2-4g) und wird deshalb täglich bis zu sechsmal umgesetzt (ca. zweimal bei jeder Mahlzeit) (28).Die Verweildauer der Gallensäuren im Plasma beträgt nur einige Minuten und ihre Konzentration im peripheren Blut ist äusserst niedrig (2-5μmol/l) (29),da die Hepatozyten eine sehr gute Clearence für die Gallensäuren besitzen.

Im Kolon werden die primären Gallensäuren durch die dort angesiedelte Bakterienflora zu freien Gallensäuren entkoppelt und dehydroxyliert (sekundäre Gallensäuren).Die so entstandenen Desoxycholsäure und Lithocholsäure werden zu etwa einem Drittel bis zur Hälfte rückresorbiert,in der Leber an Glycin oder Taurin gekoppelt und wieder in die Gallencanaliculi sezerniert (29).

2.1.4. Funktion der Gallensäuren

Die Gallensäuren sind auf Grund ihrer amphipathischen Struktur in der Lage,die Lipide Cholesterin und Lecithin in der wässrigen Gallenflüssigkeit in Lösung zu halten (8). Eine Störung des Gleichgewichts zwischen Cholesterin und Gallensäuren führt zur Auskristallisierung von Cholesterin

aus der übersättigten Gallenlösung und damit zur Bildung von Cholesteringallensteinen.Chenodesoxycholsäure und Ursodesoxycholsäure vermögen durch Hemmung des geschwindigkeitsbestimmenden Enzyms der Cholesterinsynthese (HMG-CoA-Reduktase) die Gallensteine durch Untersättigung der Galle wieder zur Auflösung zu bringen (1,4,12,34,39, 49,58,66,78,83).

Durch Herabsetzen der Oberflächenspannung sind die Gallensäuren in der Lage,die Nahrungsfette im Darm zu emulgieren.Die so erreichte Oberflächenvergrösserung ermöglicht die lipolytische Aufspaltung der Nahrungsfette zu den resorbierbaren Monoglyceriden und Fettsäuren,welche wiederum von den Gallensäuren durch Mizellenbildung in Lösung gehalten werden (61).Die an Gallensäuremizellen gebundenen Lipide sind in der Lage,schneller durch die Zellmembran zu diffundieren als freie Fette (29) und werden so enteral beschleunigt resorbiert.Die Gallensäuren aktivieren ausserdem die Pankreaslipase im Darm,die die Aufspaltung der Triglyceride erst ermöglicht (67).Sie hemmen die Magensekretion und die Cholesterinsynthese in den Kryptenzellen des Dünndarms (67).

2.1.5. Allgemeine Bemerkungen zu Mizellen

Wenn amphipathische Moleküle in Wasser gelöst werden,können sie eine Trennung ihrer hydrophoben Bezirke vom Lösungsmittel erreichen,indem sie sich zu Molekülaggregaten zusammenschliessen,bei denen sich die hydrophoben Molekülbestandteile zum Kern des Aggregates ausrichten,und die hydrophilen Teile den Kontakt zum polaren Lösungsmittel herstellen (82).Diese Molekülaggregate werden im allgemeinen als Mizellen bezeichnet (52).

Mizellen bilden sich in wässrigen Lösungen spontan aus amphipathischen Komponenten,wenn diese die kritische mizellare Konzentration (CMC) überschreiten und bei Lösungstemperaturen oberhalb der kritischen mizellaren Temperatur (CMT) (8,52,76,77).Die CMC einfacher Mizellen ist die Konzentration,bei der ein Übergang von einer monomeren Lösung

zu einer mizellaren Lösung beginnt.Die Konzentration von Monomeren oberhalb der CMC entspricht der bei der CMC, ist also oberhalb der CMC immer konstant.Die mizellenbildenden Moleküle stehen in einem dynamischen Gleichgewicht mit den freien,nicht gebundenen Molekülen (8).Bei Konzentrationserhöhungen oberhalb der CMC kann es je nach Art der mizellenbildenden Moleküle entweder zu einer Erhöhung der Mizellenzahl oder zu einer Mizellenvergrösserung kommen (51).

2.1.6. Spezielle Eigenschaften von Gallensäuremizellen

Die Gallensäuren sind polare Lipide und auf Grund ihrer amphipathischen Struktur in der Lage,Mizellen zu bilden (8).

Die Grösse und wahrscheinlich auch die Struktur der Gallensäuremizellen wird von der Art der Gallensäure,davon,ob sie konjugiert ist oder nicht,ihrer Konzentration,der Temperatur,dem pH und der Ionenstärke der Lösung beeinflusst (8).

Alle Gallensäuren,ob frei oder konjugiert,besitzen die Fähigkeit,Mizellen zu bilden.Diese Mizellen bestehen im Gegensatz zu den anderen mizellenbildenden polaren Lipiden nur aus ca. 2-10 Gallensäuremolekülen,da diese Mizellengrösse für die Gallensäuren einen energetisch günstigen Zustand darstellt (8,51,75).Strukturaufklärung dieser kleinen Mizellen mittels nuklearmagnetischer Resonanzstudien legte den Schluss nahe,dass sich die Gallensäuremoleküle mit ihren hydrophoben Bezirken Seite an Seite zusammenlegen und mit ihren hydrophilen Bezirken nach aussen zeigen (51).

Wenn die Gallensäurekonzentration steigt,fügen sich die Gallensäuremizellen zu sogenannten "sekundären" Mizellen zusammen (75),d.h. die kleinen Mizellen polymerisieren und bilden auf diese Weise sekundäre Mizellen.

Carey et al. kamen auf Grund thermodynamischer Überlegungen zu dem Schluss,dass die Bildung der sekundären Mizellen auf hydrophoben Wechselwirkungen derselben beruht (51).

Eine weitere besondere Eigenschaft der Gallensäuren besteht darin,dass im Gegensatz zu anderen Mizellenbildnern die Zahl der Monomere bei steigender Konzentration über die CMC hinaus ansteigt (48).

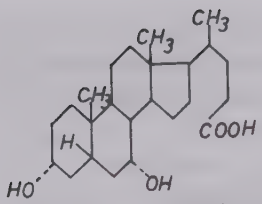
2.2. Auswahl der verwendeten Gallensäuren

Taurocholsäure (TC) wurde als Vertreter der primären, unter physiologischen Bedingungen vorzugsweise synthetisierten Gallensäuren ausgewählt.Denn die Gallensäuren liegen beim gesunden Menschen überwiegend in konjugierter Form vor,d.h. sie sind an Taurin oder Glycin gekoppelt, wodurch ihre Wasserlöslichkeit erhöht wird.Die Bindung der Gallensäuren in der Leber erfolgt vorzugsweise an Taurin,da das Glycin/Taurin-Verhältnis der konjugierten Gallensäuren nur vom Taurinangebot bestimmt wird (60). Cholsäure macht 40% der Gesamtgallensalze aus und wird in doppelter Menge wie Chenodesoxycholsäure synthetisiert.

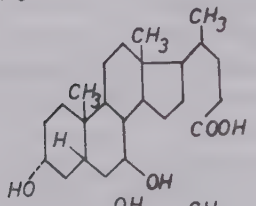
Die unkonjugierten Dihydroxygallensäuren Chenodesoxycholsäure (CDC),Ursodesoxycholsäure (UDC) und Desoxycholsäure (DC) wurden ausgewählt,da bei verschiedenen Lebererkrankungen (Leberzirrhose,Hepatitis) die Abnahme des Quotienten Trihydroxygallensäuren/Dihydroxygallensäuren und die Zunahme der unkonjugierten Gallensäuren beobachtet wird (60,61).CDC ist normalerweise in der Galle in ebenso grosser Menge (ca. 40%) vertreten wie Cholsäure,da nur ein Bruchteil der CDC im Darm bakteriell zu Lithocholsäure umgewandelt wird.Durch ihre Verwendung als Therapeutikum bei Cholesteringallensteinen verdient CDC ebenfalls besonderes Interesse (1,4,12,34,39,49,58,66,78,83).

UDC wurde zum Vergleich mit CDC herangezogen,da auch UDC in der Cholesteringallensteintherapie eingesetzt wird (1,4,12,34,39,49,58,66,78,83) und da der in klinischen Feldstudien nach CDC-Gabe beobachtete Transaminasenanstieg nach Verabreichung von UDC ausblieb.

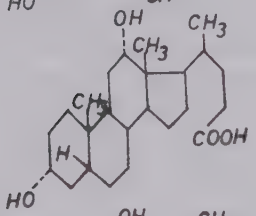
DC wird in der Literatur (5,10) als stark membranschädigendes Detergens beschrieben und wird deshalb in ihrer Wirkung mit den therapeutisch verwendeten Gallensäuren



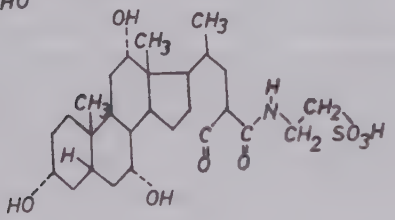
Chenodesoxycholsäure (CDC)
(3α-7α-Dihydroxy-5ß-Cholansäure)



Ursodesoxycholsäure (UDC)
(3α-7ß-Dihydroxy-5ß-Cholansäure)



Desoxycholsäure (DC)
(3α-12α-Dihydroxy-5ß-Cholansäure)



Taurocholsäure (TC)
(3α-7α-12α-Trihydroxy-
5ß-Cholansäure)

Abb.2: Strukturformeln der verwendeten Gallensäuren

CDC und UDC verglichen.Der Anteil der sekundären Gallensäure DC an den Gallensalzen macht unter physiologischen Bedingungen 20% aus.

2.3. Auswahl der Testsysteme

In der vorliegenden Arbeit sollte die unterschiedliche Toxizität der oben genannten Gallensäuren in Bezug auf die Leber untersucht werden.Es gibt jedoch viele Möglich-

keiten,die Leberzelle zu beeinflussen und zu schädigen; oft spielen dabei zahlreiche,grösstenteils unbekannte Faktoren eine Rolle,so dass es schwer ist,den Wirkungsmechanismus im einzelnen zu erkennen.Bei der Wahl der Testsysteme zur Untersuchung dieser Wechselwirkung zwischen Gallensäuren und Leberzellen schien es daher von Vorteil,sich auf die Messung solcher Parameter zu beschränken,die auf möglichst wenige Faktoren zurückgeführt werden konnten.

Zu diesem Zweck wurde sowohl die Inkubation von isolierten Hepatozyten mit Gallensäuren als auch die Perfusion der intakten Leber verwendet.Beide Methoden wiesen gewisse Vorteíle sowie auch Nachteile auf.

Inkubationsversuche mit isolierten Zellen bieten den Vorteil,dass die Zellausbeute so gross ist,dass man verschiedene Gallensäuren in unterschiedlicher Konzentration gleichzeitig und unabhängig voneinander untersuchen und direkt vergleichen kann.Da es sich um eine einheitliche Zellpopulation handelt,kann man individuelle Unterschiede in der Reaktion der Hepatozyten auf die Gallensäuren ausschliessen.Ausserdem kann man mit direkten Kontrollen arbeiten und Schwankungen in der Qualität der jeweiligen Präparation ausgleichen.

Andererseits haben Perfusionsversuche gegenüber Versuchen mit isolierten Zellen den Vorteil,dass die Leber als intaktes Organ untersucht wird.Die einzelnen Zellen werden nicht durch mechanische und enzymatische Verfahren strapaziert.Durch diese Verfahren möglicherweise vorgeschädigt, würden sie empfindlicher reagieren,als es physiologischerweise der Fall wäre.Ausserdem sind sie im Zellverband nicht an allen Seiten von Gallensäuren umgeben,sondern die Zellmembran kommt nur an einer Seite mit den Gallensäuren in Kontakt,was den Zellen eher die Möglichkeit gibt,die schädigende Noxe abzuwehren.Man kann also davon ausgehen,dass der intakte Zellverband unempfindlicher reagiert als isolierte Zellen,und dass ein Versuch an

der perfundierten Leber eher die physiologischen Verhältnisse widerspiegelt.

Als Indikator für eine Zellschädigung wurde der Enzymaustritt von LDH-1 und GOT verwendet,da sich diese Enzyme als relativ stabil gegenüber den Gallensäureeinflüssen erwiesen hatten (64).Der Verlust von Zellenzymen an den extrazellulären Raum ist ein subtiler Nachweis für Veränderungen an der Zellmembran,die licht- und elektronenmikroskopisch noch nicht erkennbar sind (70).Ausserdem kann man im Verlauf der Perfusion bzw. Inkubation den Enzymaustritt in kurzen Zeitabständen überwachen,so dass Messfehler durch eine längere Zeitspanne zwischen Schädigung und Messung ausgeschlossen werden können.Elektronenmikroskopische Untersuchungen kann man dagegen nur nach Abschluss der Perfusion durchführen (55).

Als Medium wurden sowohl für die Perfusion als auch für die Inkubation mit isolierten Hepatozyten mit Carbogen begastes Standardmedium verwendet,dessen Zusammensetzung aus Tabelle 2 zu ersehen ist.Obwohl in der Literatur oft Versuche mit erythrozytenhaltigem Medium (21,55) beschrieben wurden,wurden keine Erythrozyten verwendet,um bei der Messung des Enzymaustritts aus den Hepatozyten Verfälschungen durch evtl. Hämolyse zu vermeiden.

Auch auf Albumin wurde verzichtet,da die Bindung der Gallensäuren an Albumin deren Wirksamkeit herabsetzen könnte. Ausserdem könnten möglicherweise unterschiedliche Affinitäten der Gallensäuren zu Albumin zu einem verzerrten Bild beim Vergleich der Toxizität dieser Gallensäuren führen.

Tab.2: Standardmedium

pro 1l Aqua bidest.:

122	mM NaCl	0,44	mM $KHPO_4$
5,6	mM KCl	1,0	mM $CaCl_2$
0,4	mM $MgSO_4 x7\ H_2O$	5,05	mM Glucose x H_2O
0,5	mM $MgCl_2 x6\ H_2O$	22,5	mM $NaHCO_3$
0,34	mM $Na_2HPO_4 x2\ H_2O$		Ionenstärke 0,21

3. MATERIALIEN

Tiere: Ratten mit einem Gewicht von 250-350g wurden von der Tierzuchtanstalt Ivanovas,Kisslegg,bezogen. Es handelte sich um weibliche Wistar-Ratten,die bei einer Altrominstandarddiät und Wasser ad libitum gehalten wurden.

Chemikalien:

Collagenase: (E.C. 3.4.4.19) aus Clostridium histolyticum, lyophilisiert,
von Boehringer,Mannheim,Bestell-Nr. 103578

Monotest von Boehringer,Mannheim:
HBDH opt. Bestell-Nr. 124800
GOT opt. Bestell-Nr. 124362

Desoxycholsäure-Na_4-Salz: rein 95% MG: 415
von Serva,Bestell-Nr. 18330

Chenodeoxycholic Acid: rein 95% MG: 393
von Sigma,Bestell-Nr. C-9377

Ursodeoxycholic Acid: rein 95% MG: 393
von Sigma,Bestell-Nr. U-2002

Taurocholic Acid: rein 98% MG: 538
von Sigma,Bestell-Nr. T-4009

Trypanblaulösung: 0,5% in physiologischer NaCl-Lösung
von Serva,Bestell-Nr. 47285

Braunülen: 0,5 mm, 618 Record
von Braun Melsungen

Albumin: aus Rinderserum,lyophilisiert,92% rein
(Cohn Fraktion V),
von Serva,Bestell-Nr. 11930

Liquemin: 25000 USP in 5 ml (Na-Heparinat)
Hoffmann-LaRoche AG,Reg.-Nr. 47197

Nembutal^R: (Na-Pentobarbital) 60mg/ml,
Abbot S.A.,Belgien

Nylonnetz: Maschenweite 150µm
Filtertechnik B+S Seebach,Vellmar

Aqua bidest.: Für die Untersuchungen wurde zweimal in einer Quarzapparatur destilliertes Wasser verwendet.

Die gebräuchlichen Laborchemikalien stammen von Merck, Darmstadt.

4. METHODEN

4.1. Bestimmung der Enzymaktivität

Die Aktivität der Enzyme wurde photometrisch bei 25°C und 340 nm bestimmt.Als Testansatz fanden die entsprechenden Monotests von Boehringer Mannheim Verwendung (siehe 3.).Die Angabe der Aktivitäten erfolgte in U/l (units pro Liter,1U ≙ 1 µmol umgesetztes Substrat pro Minute).

4.2. Hepatozytenisolierung

Die Hepatozytenisolierung erfogte bis auf unwesentliche Modifikationen nach dem von Dr. Bruchelt,Labor der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen,erarbeiteten Verfahren (7).

4.2.1. Operation und Vorperfusion

Die Ratte wurde zunächst durch eine i.p. Nembutal$_R$-Injektion (0,1 ml/100g Körpergewicht) narkotisiert.Um Blutgerinnsel in der Leber zu vermeiden,wurden dann 150 µl Heparin in die Vena femoralis injiziert.

Nach Eröffnung des Bauchraumes wurde anschliessend je eine lose Schlinge um die Vena cava inferior oberhalb der Vena renalis und um die Vena portae gelegt.Mittels einer Braunüle (0,5mm Braun Melsungen) kanülierte man dann die Pfortader,schloss das Perfusionssystem an und durchtrennte gleichzeitig die Vena cava inferior unterhalb des Nierenvenenabganges,so dass die Leber innerhalb kurzer Zeit entblutet wurde.

Das Medium für diese Vorperfusion (Standardmedium Tab.2) ohne Ca war 37°C warm und wurde mit Carbogen begast. Eine Peristaltikpumpe sorgte für einen Perfusionsstrom von ca. 40 ml/min.Um eine Luftembolie in der Leber zu vermeiden,befand sich zwischen Pumpe und Braunüle eine Luftblasenfalle.

Tab.2: Standardmedium
pro 1l Aqua bidest.:

122	mM	NaCl
5,6	mM	KCl
0,4	mM	$MgSO_4 x 7\ H_2O$
0,5	mM	$MgCl_2 x 6\ H_2O$
0,34	mM	$Na_2HPO_4 x 2\ H_2O$
0,44	mM	$KHPO_4$
1,0	mM	$CaCl_2$
5,05	mM	Glucose x H_2O
22,5	mM	$NaHCO_3$

Ionenstärke 0,21

Im Folgenden wurde der Brustraum eröffnet-das Zwerchfell durfte nun durchschnitten werden,da die Leber bereits mit O_2-haltigem Medium perfundiert wurde,das die O_2-Versorgung übernommen hatte.
Um den oberhalb des Zwerchfells gelegenen Abschnitt der Vena cava inferior wurde eine weitere lockere Schlinge gelegt.Eine zweite Braunüle 0,5 wurde über den Vorhof des rechten Herzens in dieses Gefäss eingeführt und mittels der Schlinge befestigt.

Durch anschliessendes Zuziehen der Schlinge oberhalb des Nierenvenenabganges und Umstecken des Perfusionssystems von der Pfortader in die zweite Braunüle wurde nun die Perfusionsrichtung umgekehrt:Das Medium strömte über die Vena cava inferior und die Venae hepaticae durch die Leber und trat aus der Pfortader aus.

Dies widerspricht zwar der physiologischen Flussrichtung, bietet aber Vorteile für den weiteren Verlauf der Zellisolierung:

Zum einen ist die Vena cava inferior mechanisch stabiler als die Vena portae;die Pfortader neigt bei der Herauspräparation der Leber zu Verdrillungen,was zur Störung der Leberdurchblutung führen könnte.Ausserdem kann man die Braunüle besser und dauerhafter in der Vena cava inferior

befestigen.Zum anderen wird die Pfortader im Gegensatz zur Vena cava bei längerer Perfusion mit Collagenase brüchig.Von Beginn an diese Perfusionsrichtung zu verwenden, wie es einige Arbeitsgruppen beschreiben (11),hat jedoch nach Untersuchungen von Dr. Bruchelt (7) den Nachteil,dass die Leber dadurch häufig schlecht entblutet wird.

Zum Schluss wurde die Leber vorsichtig aus der Ratte herauspräpariert,wobei man besonders darauf achten musste, dass die im Zwerchfell liegende Vena cava inferior nicht verletzt wurde.

4.2.2. Medium für die Vorperfusion

Für die operative Perfusionsphase wurde ein Ca-freies Medium verwendet.Denn anscheinend gibt es einen Ca-abhängigen Faktor,der zum Zusammenhalt der Zellen beiträgt (35, 42,57,73).Das Fehlen des Calciums begünstigt damit bereits die Loslösung der Zellen aus dem Zellverband.

Diesen Ca-Mangel kann man entweder durch Zugabe eines Komplexbildners wie z.B. Citrat oder EGTA erreichen (35, 42).Oder aber man verwendet wie in dieser Arbeit Ca-freies Medium (Standardmedium ohne Ca,Tab.2) im Zusammenhang mit einer nicht rezikulierenden Perfusion,so dass das noch in der Leber vorhandene Calcium ausgewaschen wird.Dafür ist eine mindestens 10-15 minütige Perfusion (7) erforderlich.

Wenn die Leber also einmal an das Perfusionssystem angeschlossen ist,kann man sich genügend Zeit lassen,um die Leber aus der Ratte herauszupräparieren.

4.2.3. Perfusion mit Collagenase

Anschliessend wurde die Leber auf eine Siebplatte gelegt und mit der Braunüle in der Vena cava an ein rezirkulierendes Perfusionssystem angeschlossen,das sich in einer 37°C warmen und mit Feuchtigkeit gesättigten Kammer befand (Abb.3).Das im Zirkulationsreservoir enthaltene Medium (100 ml) der gleichen Zusammensetzung wie bei der

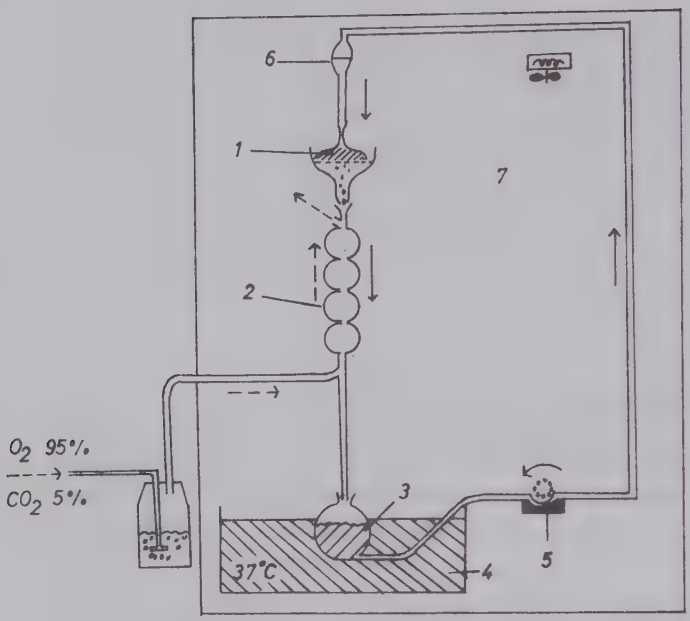


Abb.3: Schematische Darstellung des Perfusionssystems bei der Hepatozytenisolierung
1,Leber auf Siebplatte,perfundiert durch Vena cava inferior;2,Glaslunge;3,Zirkulationsreservoir,enthält 100ml Perfusionsmedium mit Collagenase; 4,Wasserbad (37℃);5,Peristaltikpumpe;6,Luftblasenfalle;7,feuchte Kammer.

Vorperfusion wurde ebenfalls mit Carbogen begast.Nach Einbringen der Leber in dieses System wurden 50 mg Collagenase pro 100 ml und $CaCl_2$ (1 mmolar) hinzugefügt.

Frühere Arbeitsgruppen hatten zusätzlich zur Collagenase noch Hyaluronidase verwendet (31,32);andere konnten bei zusätzlicher Verwendung von Hyaluronidase keinen günstigeren oder stärkeren Effekt feststellen (84).Nach Seglen (74)

soll Hyaluronidase sogar eine hemmende Wirkung zeigen. Aus diesem Grunde und wegen der guten Erfahrungen von Dr. Bruchelt (7) wurde in dieser Arbeit nur Collagenase benutzt.

Da bekannt ist,dass für die Aktivität von Collagenase Calcium erforderlich ist (23),wurde die Perfusion in Anwesenheit von Calcium (1 mmolar) durchgeführt.Ausserdem ist beschrieben worden,dass mit Calcium/Collagenase isolierte Zellen von besserer Qualität seien (2,3). Nicht zuletzt wurde in dieser Arbeit deshalb mit Calcium gearbeitet,da Calcium ein wichtiger Faktor für die Stabilität und Integrität der Membran sein soll (2).Denn die Zellmembran sollte möglichst im unveränderten,d.h. soweit wie möglich physiologischen,Zustand auf ihre Wechselwirkung mit Gallensäuren untersucht werden.

Nach 25-30 Minuten wurde die Leber weich und verlor ihre Form.Man gab die Leber dann in eiskaltes Medium (Zusammensetzung wie oben,mit Calcium;Tab.2) und entfernte unter ständiger Begasung mit Carbogen die die Leber umschliessende Capsula fibrosa mittels zweier Pinzetten.

Die so gewonnene Zellsuspension wurde in einen Rundkolben gegeben.Durch kurzes (5 min),schonendes Rotieren am mit Carbogen begasten Rotationsverdampfer wurden noch bestehende Zellaggregate gelöst.Noch vorhandene Bindegewebsreste wurden danach in einem Nylonnetz (Maschenweite 150 µm) zurückgehalten.

Anschliessend wurden die Hepatozyten durch dreimaliges Zentrifugieren (ca. 1 min) bei 50 g,Absaugen des Überstandes und erneutes Auffüllen mit Medium (Tab.2) gewaschen.

Danach wurden die Zellen unter dem Mikroskop ausgezählt. Je nach Ergebnis der Auszählung wurde die Suspension dann verdünnt und zu den Inkubationsansätzen gegeben.

4.3. Vitalitätstest (isolierte Hepatozyten)

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurden folgende Parameter herangezogen:

4.3.1. Anfärbbarkeit mit Trypanblau

Zellsuspension und 0,5% ige Trypanblaulösung wurden zu gleichen Teilen gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Der Anteil der angefärbten Zellen wurde dann mikroskopisch bestimmt, wobei mindestens 300 Zellen ausgezählt wurden.

4.3.2. Atmungsstimulation mit Succinat

Der Succinattest reagiert weitaus empfindlicher auf eine Zellschädigung als der Trypanblautest (3). Da geringe Vorschädigungen der Zellen, die durch den Trypanblautest noch nicht angezeigt werden, bei der späteren Inkubation mit Gallensäuren die Ergebnisse hätten verfälschen können, war es wichtig, die Membranpermeabilität für Succinat ebenfalls zu untersuchen.

Diese Messung wurde mittels einer modifizierten Clark-Elektrode durchgeführt (Sauerstoffgerät der Firma Bachofer, Reutlingen) (14). Bei 25°C wurde folgendes Medium: 0,15 M KCl, 6 mM MgCl, 0,01 M Tris/HCl, 1,5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH=7,2, mit O_2 gesättigt und in das Reaktionsgefäss gegeben. Die Eichung des Gerätes wurde wie folgt durchgeführt: Der Wert des mit Sauerstoff gesättigten Basismediums diente als Reverenzpunkt für den 100%-Wert. Nach Entfernung des Sauerstoffs mittels Natriumthiosulfat ($Na_2S_2O_4 + O_2 + H_2O \longrightarrow NaHSO_4 + NaHSO_3$) wurde der 0%-Wert am Schreiber eingestellt. Anschliessend wurde anstelle des Basismediums 1ml mit Carbogen begaster Zellsuspension in das Reaktionsgefäss gegeben. Nach Bestimmung der Zellatmung ohne Succinat wurde dann 10µl Succinatlösung (100mM/l) hinzugefügt und die Zellatmung in Anwesenheit von Succinat ermittelt. Der Quotient

Succinatrespiration/endogene Respiration beträgt günstigstenfalls 1,0 und sollte 1,2 (20% Stimulation) nicht überschreiten (71,72).

4.4. Inkubation der isolierten Hepatozyten mit Gallensäuren

Die endgültige Zellsuspension erbrachte eine Ausbeute von ca. $8x10^6$ Zellen pro 1ml und wurde ab einer Vitalität von ca. 90% beim Trypanblautest bzw. einem Atmungsquotienten von 1,2 verwendet.

1ml Zellsuspension wurde mit je 9ml unterschiedlich konzentrierter Gallensäurelösung von DC und CDC 30 Minuten lang bei 37°C im Rotationsschüttler (nach Beckert und Steinbrenner) inkubiert.Die Gallensäuren waren dabei ebenso wie die Hepatozyten im oben beschriebenen Standardmedium (Tab.2) gelöst.Nach 15 und 30 Minuten wurden aus dem Überstand Proben zur Messung des Enzymaustritts entnommen.

Da Vorversuche gezeigt hatten,dass die Hepatozyten bei einer Konzentration von 1g/l sowohl von CDC (ca. 2500µM/l) als auch von DC (ca. 2500µM/l) lichtmikroskopisch sichtbar vollständig zerstört wurden,wurden für die Inkubation folgende Konzentrationen gewählt:125,250,500,1000 und 1500µM/l.

Die in den Proben gemessene Enzymaktivitäten wurden jeweils auf 1mg Protein bezogen.

4.5. Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehalts kam die Methode von Lowry (46),modifiziert nach (18) zur Anwendung.Die zu untersuchende Zellsuspension wurde zu diesem Zweck zunächst durch Ultraschallbehandlung (t=20 sec.) homogenisiert.Aliquote aus diesem Homogenat wurden dann nach vorheriger Verdünnung (1 : 50 - 1 : 100) für die Messung verwendet.Für die Eichkurve wurde eine Verdünnungsreihe aus Rinderalbumin verwendet.

4.6. Leberperfusion mit Gallensäuren

Zur Herauspräperation der Rattenleber wurde die gleiche Operationstechnik wie bei der Hepatozytenisolierung angewendet. Die Vorperfusion wurde aber im Gegensatz zum Isolierungsvorgang bereits mit Ca-haltigem Medium durchgeführt, da der Zusammenhalt der Zellen nicht beeinträchtigt werden sollte.

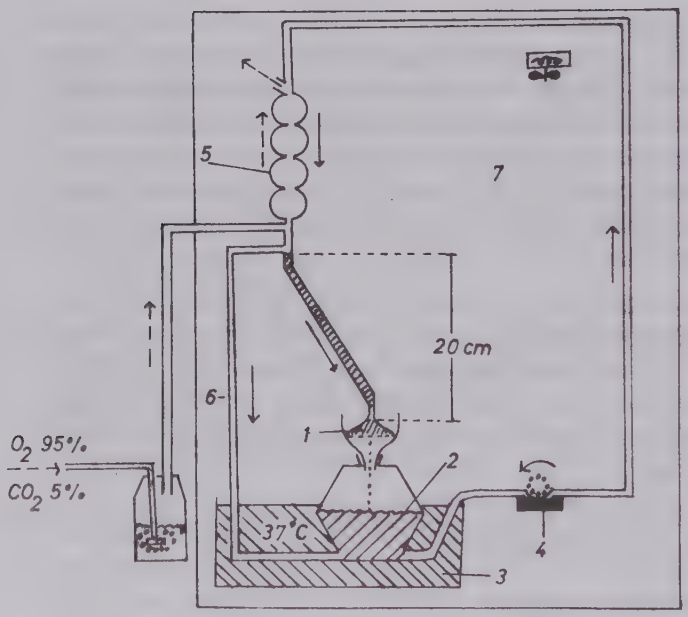


Abb.4: Schematische Darstellung des Perfusionssystems bei der Leberperfusion
1, Leber, perfundiert durch Vena cava inferior; 2, Zirkulationsreservoir, enthält 200ml Perfusionsmedium mit Gallensäure; 3, Wasserbad; 4, Peristaltikpumpe; 5, Glaslunge; 6, Überlauf; 7, feuchte Kammer.

Anschliessend wurde die Leber an ein Perfusionssystem (Abb.4) angeschlossen,das so modifiziert worden war, dass die Leber mit einem Druck von 20cm H_2O durchspült wurde.Die Perfusion erfolgte ebenfalls mit begastem 37°C warmem Ca-haltigem Standardmedium (Tab.2).Pro untersuchte Gallensäure wurden jeweils 2 Perfusionen durchgeführt,bei CDC 3.

Als Mass für die Vitalität des Organs und als Kontrollwert wurde nach 15-minütiger Perfusion ohne Gallensäure eine Probe entnommen.Dann wurde die zu untersuchende Gallensäure in das Perfusionsreservoir (200ml Standardmedium) gegeben und alle 15 Minuten die Konzentration erhöht.5 und 15 Minuten nach jeder Konzentrationserhöhung

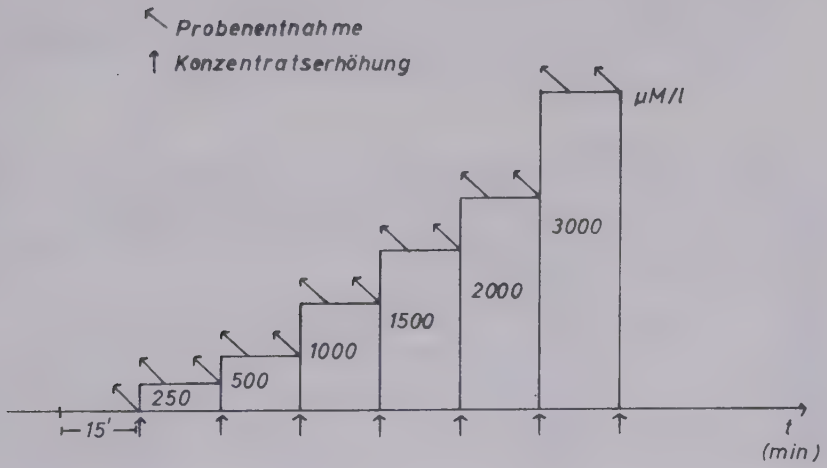


Abb.5: Schematische Darstellung der stufenweisen Konzentrationserhöhung und Probenentnahme bei der Leberperfusion.Nähere Erläuterungen siehe Text.

wurde eine Probe für die Messung des Enzymaustritts entnommen. Das entnommene Probenvolumen wurde durch die Zugabe der gleichen Menge eines Gallensäurekonzentrats ersetzt, die zur Erreichung der nächsten Konzentrationsstufe erforderlich war. In Anlehnung an die vorausgegangenen Versuche wurden folgende Konzentrationen gewählt: 250, 500, 1000, 1500, 2000 und 3000 µM/l (Abb. 5).

Die beiden höchsten Konzentrationsstufen wurden in der Erwartung gewählt, dass sich das intakte Organ als widerstandsfähiger als die isolierten Hepatozyten erweisen würde.

Um eine Leberschädigung allein schon durch die lang dauernde Perfusion im oben beschriebenen System auszuschliessen, wurde ausserdem noch eine Perfusion ohne Gallensäure über 105 Minuten durchgeführt.

Die Enzymaktivitäten in den Proben wurden unmittelbar nach Entnahme gemessen, um Aktivitätsverluste durch Einfrieren oder längeres Stehen zu vermeiden.

4.7. Statistik

Um festzustellen, ob es sich bei den Versuchen mit isolierten Hepatozyten um einen signifikanten Enzymaustritt handelt, kam der doppelte t-Test für unverbundene Zufallsstichproben zur Anwendung.

Die Konzentration, bei der während der Leberperfusion ein signifikanter Enzymaustritt erfolgte, wurde wiederum mit Hilfe des t-Differenzentests für paarige Zufallsstichproben ermittelt.

5. ERGEBNISSE

5.1. Hepatozyteninkubation mit CDC und DC (Abb. 6-9)

Es wurden die isolierten Hepatozyten zweier Rattenlebern verwendet (ca. 9g).Jede Zellpopulation wurde dabei mit beiden Gallensäuren in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert,um einen direkten Vergleich zwischen den Gallensäuren herstellen zu können.Ausserdem wurde mit direkten Kontrollen gearbeitet (je zwei Kontrollinkubationen ohne Gallensäure).

Der Enzymaustritt zeigte bei beiden Gallensäuren DC und CDC in Abhängigkeit von der Konzentration einen ähnlichen Verlauf:Von einer bestimmten Schwelle ab stieg die Aktivität der Enzyme im Überstand steil an und näherte sich bei hohen Konzentrationen einem Sättigungswert.Bei beiden Gallensäuren war LDH-1 immer in geringerer

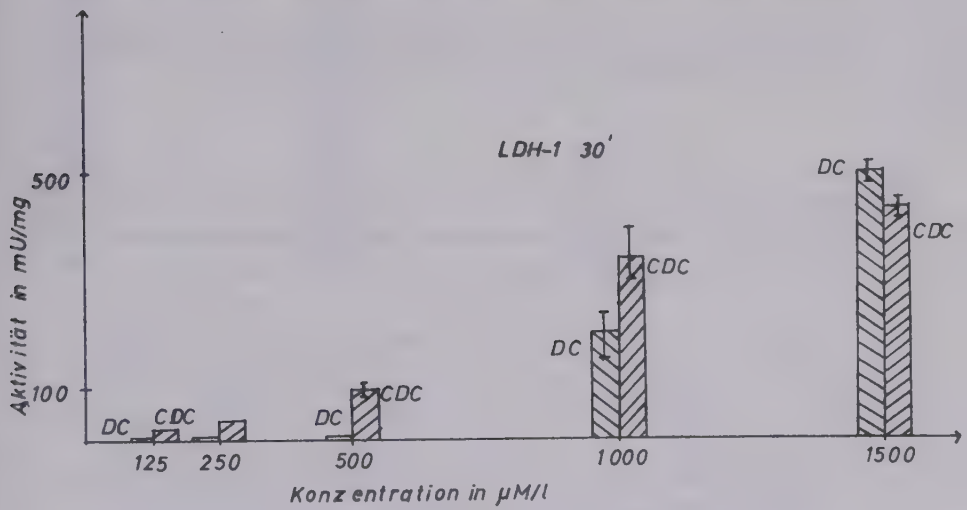


Abb.6: Zellinkubation mit DC und CDC.Messung der LDH-1 Aktivität im Überstand.(n=2) Aktivität in mU/mg Protein.Tab.9 u. 10 siehe Tab. Anhang.

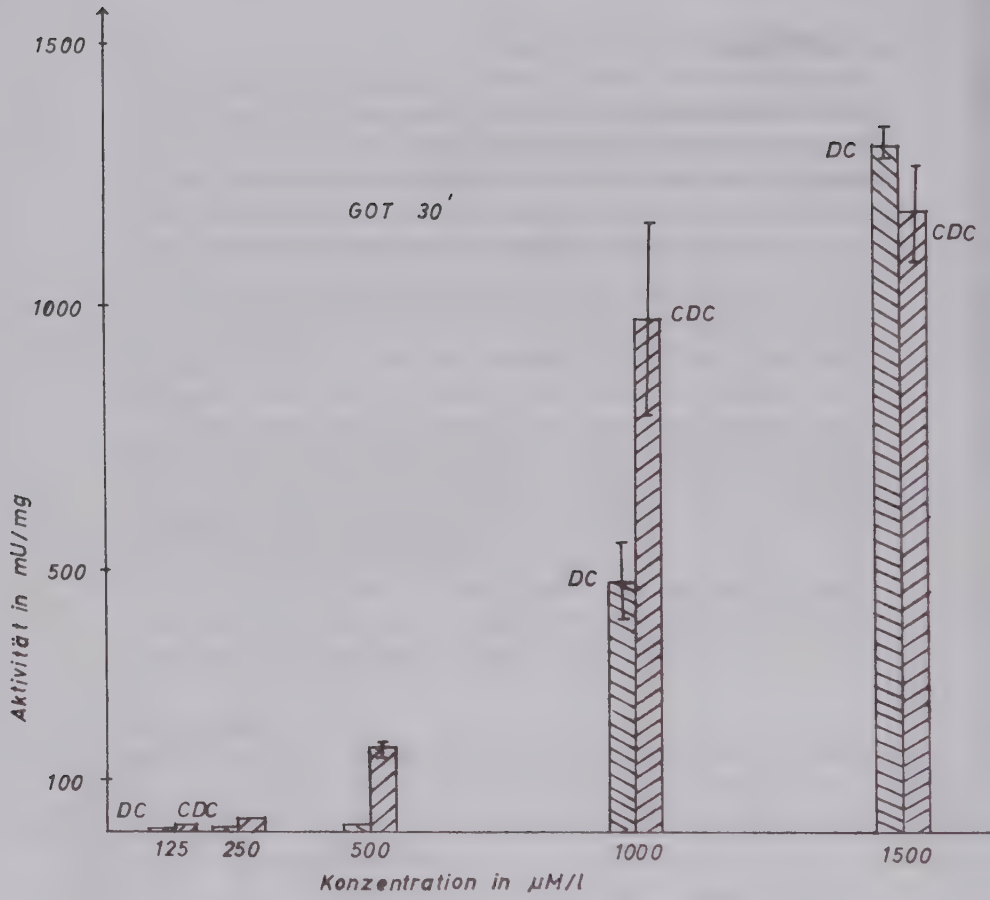


Abb.7: Zellinkubation mit DC und CDC.Messung der GOT Aktivität im Überstand.(n=2) Aktivität in mU/mg Protein.Tab.9 u. 10 siehe Tab. Anhang.

Aktivität als GOT im Überstand vorhanden,was auf den geringeren LDH-1 Gehalt der Leberzelle zurückzuführen ist (69).Die maximalen Enzymaktivitäten von LDH-1 und GOT erreichten bei beiden Gallensäureninkubationsreihen nahezu identische Werte.

Beim Vergleich der Gallensäuren wurde als Schwelle die niedrigste Konzentration bezeichnet,die zu einem signi-

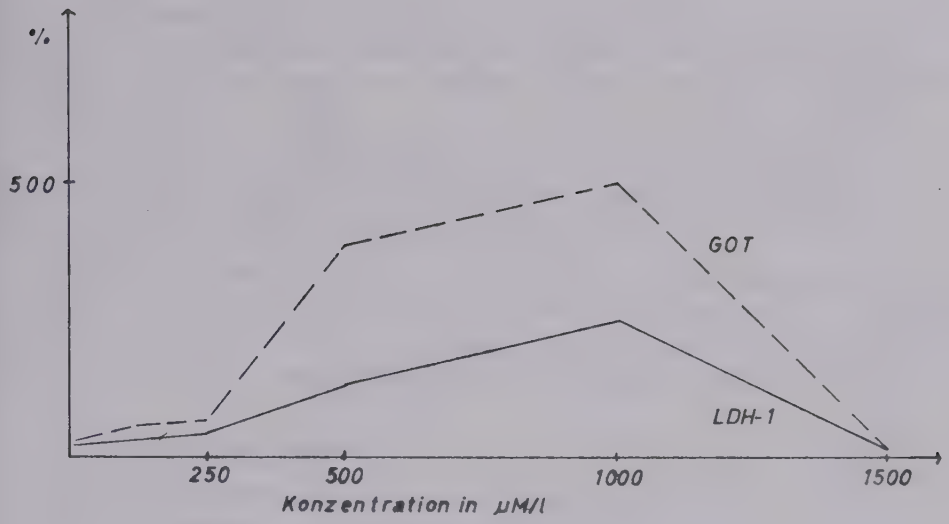


Abb.8: Prozentualer Anstieg des Enzymaustritts bei CDC, bezogen auf den Wert der vorhergehenden Konzentration.

fikanten Aktivitätsanstieg beider Enzyme im Überstand führte.CDC zeigte in einer geringeren Konzentration eine membranschädigende Wirkung als DC,und zwar lag die Schwellenkonzentration von CDC bei 500µM/l,während die von DC bei 1000µM/l lag.

Obwohl es durch DC erst bei 1000µM/l zu einem signifikanten Enzymaustritt kam,stieg die Aktivität im Überstand steiler an als bei CDC.Dies spricht für eine starke Schädigung der Zellmembran innerhalb eines engen Gallensäurenkonzentrationsbereichs.Der Enzymaustritt stieg beim Übergang von 500µM/l auf 1000µM/l DC weit über 1000% sowohl bei LDH-1 als auch bei GOT an (Abb.9).Demgegenüber verursachte CDC einen flacheren Austrittsverlauf der Zellenzyme,was eher für eine allmähliche Einwirkung von CDC auf die Zellmembran innerhalb eines grösseren Konzentrationsbereiches spricht.

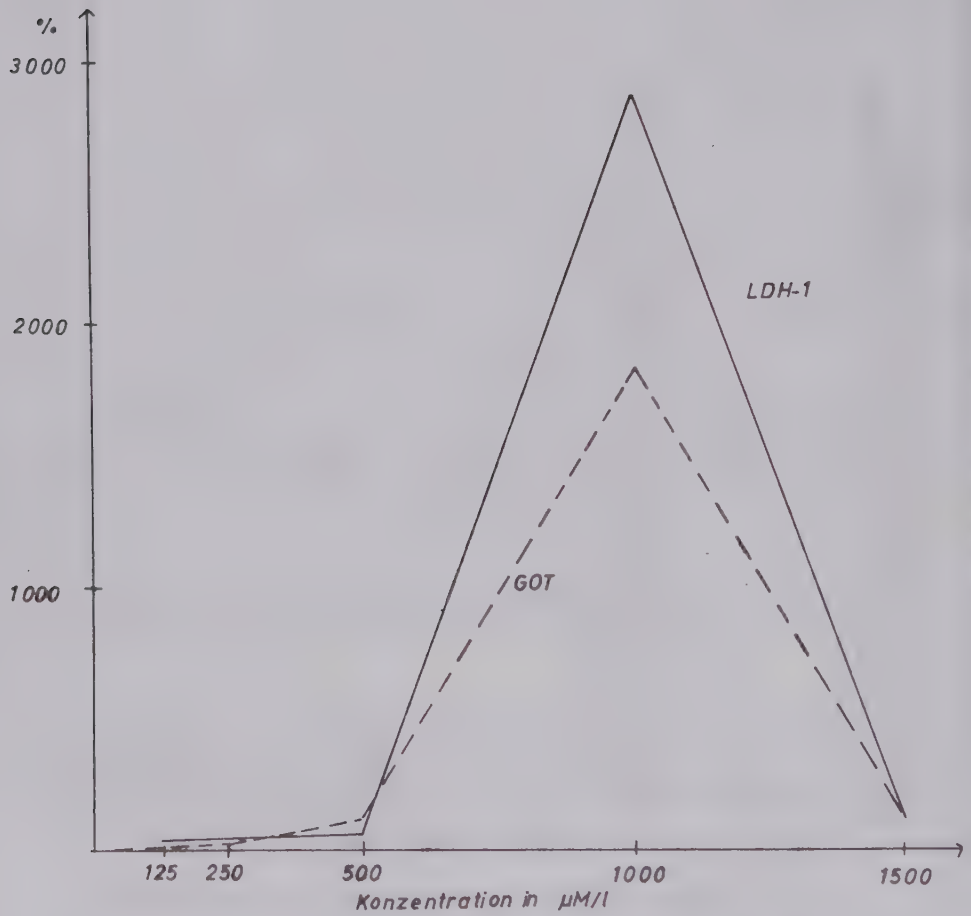


Abb.9: Prozentualer Anstieg des Enzymaustritts bei DC, bezogen auf den Wert der vorhergehenden Konzentration.

Wenn man den prozentualen Anstieg der Aktivität bei einer bestimmten Konzentration bezogen auf den Wert der vorhergehenden Konzentration graphisch darstellt (Abb.8 und 9),kommen die unterschiedlichen Verläufe des Enzymaustritts gut zur Geltung:Der Kurvenverlauf zeigt zum einen

die Konzentration,bei der die maximale Schädigung erfolgt,zum anderen zeigt sie durch ihren Verlauf,ob es sich um eine abrupt oder langsam einsetzende Schädigung handelt.

Bei DC ist der Schwellenwert von 1000µM/l mit dem Wert des höchsten prozentualen Anstiegs identisch.Es findet also ein sehr plötzlicher Enzymaustritt statt.

Dagegen setzt die Schädigung bei CDC zwar beim Schwellenwert von 500µM/l ein,aber der maximale prozentuale Anstieg der Enzyme im Überstand liegt erst bei 1000µM/l, was für eine langsam einsetzende Schädigung spricht.

5.2. Leberperfusion

5.2.1. Leberperfusion mit DC,CDC,UDC und TC (Abb.10-15)

Die graphische Darstellung der Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von der Gallensäurekonzentration zeigt einen ähnlichen Verlauf,wie er bereits bei den isolierten Hepatozyten gefunden wurde:Auch hier ergab sich zuerst nach Überschreiten einer Schwellenkonzentration ein Anstieg der Enzymaktivität mit Annäherung an einen Maximalwert.

Im verwendeten Messbereich zwischen 250 und 3000µM/l konnte bei CDC und DC (Abb.10 u. 11) dieser Austrittsverlauf beobachtet werden,während bei UDC und TC (Abb. 12 u. 13) nur ein allmählicher Enzymaustritt und nicht die Annäherung an einen Maximalwert im Messbereich lag.

Versuche mit unterschiedlichen Lebern (9-10g) bei gleicher Gallensäure führten zu unterschiedlichen Maximalwerten.Wie auf Grund der Enzymausstattung der Leber zu erwarten war (69),lag der Wert von LDH-1 immer unterhalb des Wertes von GOT.

Für den Vergleich der einzelnen Gallensäuren auf die perfundierte Leber wurde die niedrigste Konzentration herangezogen,bei der im Vergleich zur vorhergehenden Konzentration ein signifikanter Enzymaustritt vorhanden

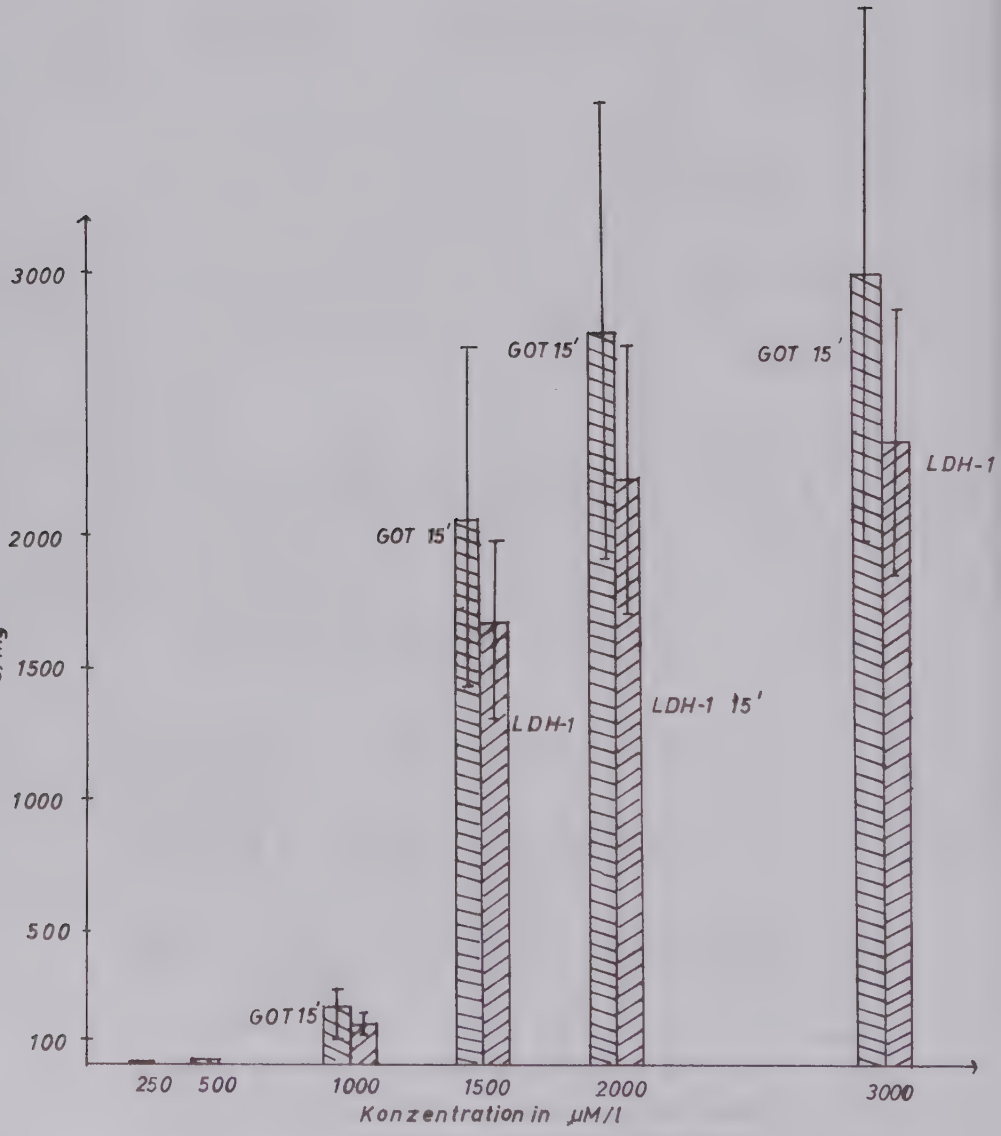


Abb.10: Leberperfusion mit DC.Austrittsverlauf von LDH-1 und GOT. (n=2)
Enzymaktivitäten in mU/mg +/- SEM siehe Tab.11

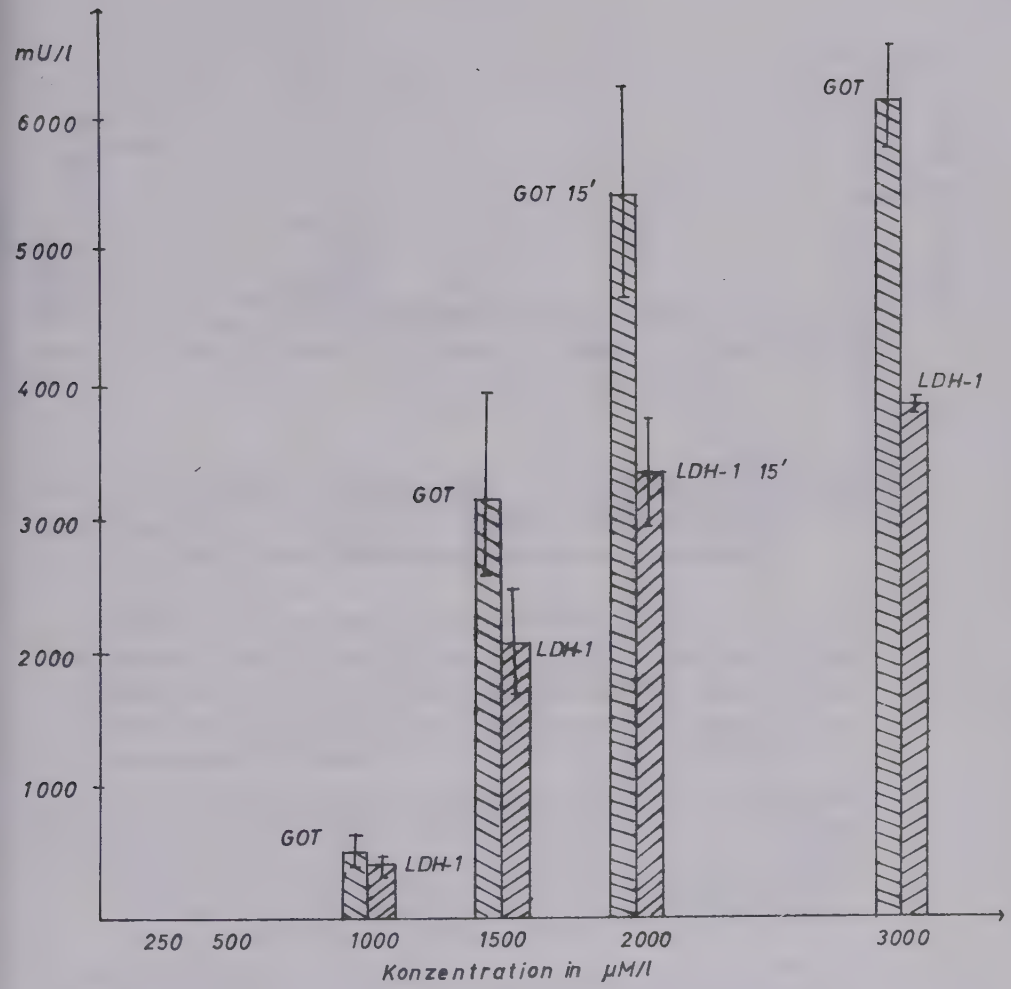


Abb.11: Leberperfusion mit CDC. Austrittsverlauf von LDH-1 und GOT. (n=2)
Enzymaktivitäten in mU/mg +/- SEM siehe Tab.12

war. Dieser Schwellenwert liegt für die Enzyme LDH-1 und GOT immer bei derselben Konzentration.

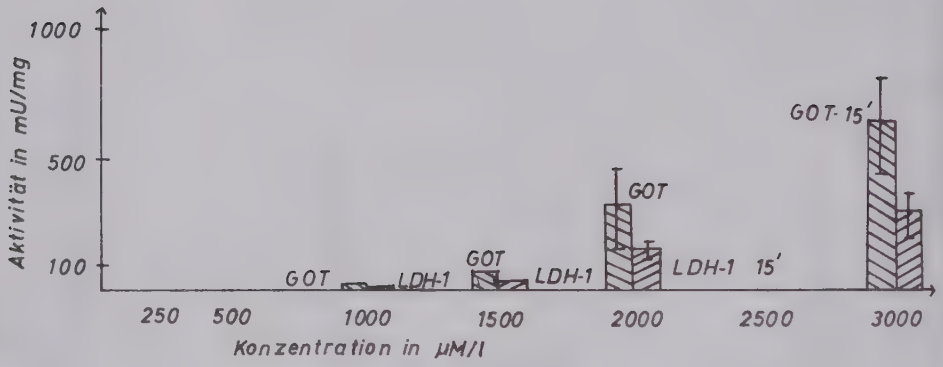


Abb.12: Leberperfusion mit UDC. Austrittsverlauf von LDH-1 und GOT. (n=2)
Enzymaktivität in mU/mg +/- SEM siehe Tab.13

Beim Vergleich der Enzymaustritte kann man zwei Gruppen von Gallensäuren unterscheiden: CDC und DC verursachten bei geringer Schwellenkonzentration einen starken Enzymaustritt und hohe Maximalwerte, wohingegen bei UDC und TC die Schwelle zu höheren Konzentrationen hin verschoben war, der Aktivitätsanstieg eher allmählich erfolgte und weitaus geringere Maximalwerte bei 3000µM/l erreicht wurden. Die Schwellenwerte von CDC und DC unterschieden sich im Gegensatz zu den Ergebnissen bei den isolierten Zellen nicht und lagen beide bei 1000µM/l.

UDC und TC wiesen wesentlich höhere Schwellenwerte auf, die bei UDC 2000µM/l und bei TC zwischen 2000 und 2500µM/l betrugen. Es ergaben sich somit signifikante Unterschiede in der Wirksamkeit der beiden Gruppen von Gallensäuren (siehe Tab.3): Die Gruppe mit CDC und DC war weitaus stärker toxisch als die Gruppe mit TC und UDC, da CDC und DC bei einer Konzentrationssteigerung von 500 auf 1000µM/l einen schlagartigen Anstieg des Enzymaustritts auf Werte zeigte, die nahe den Maximalwerten

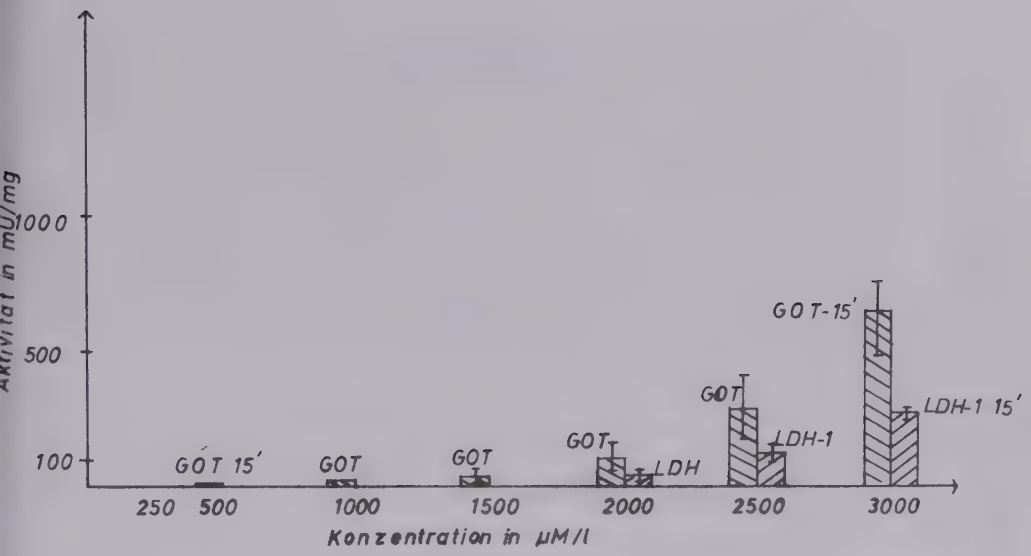


Abb.13: Leberperfusion mit TC. Austrittsverlauf von LDH-1 und GOT. (n=2)
Enzymaktivität in mU/mg +/- SEM siehe Tab.14

lagen. Demgegenüber ergaben Steigerungen der Konzentration bei der Gruppe mit TC und UDC eine relativ geringe Zunahme des Enzymaustritts. Selbst bei 3000µM/l lagen die Enzymaktivitäten im Überstand weit unterhalb des erreichbaren Maximalwertes.

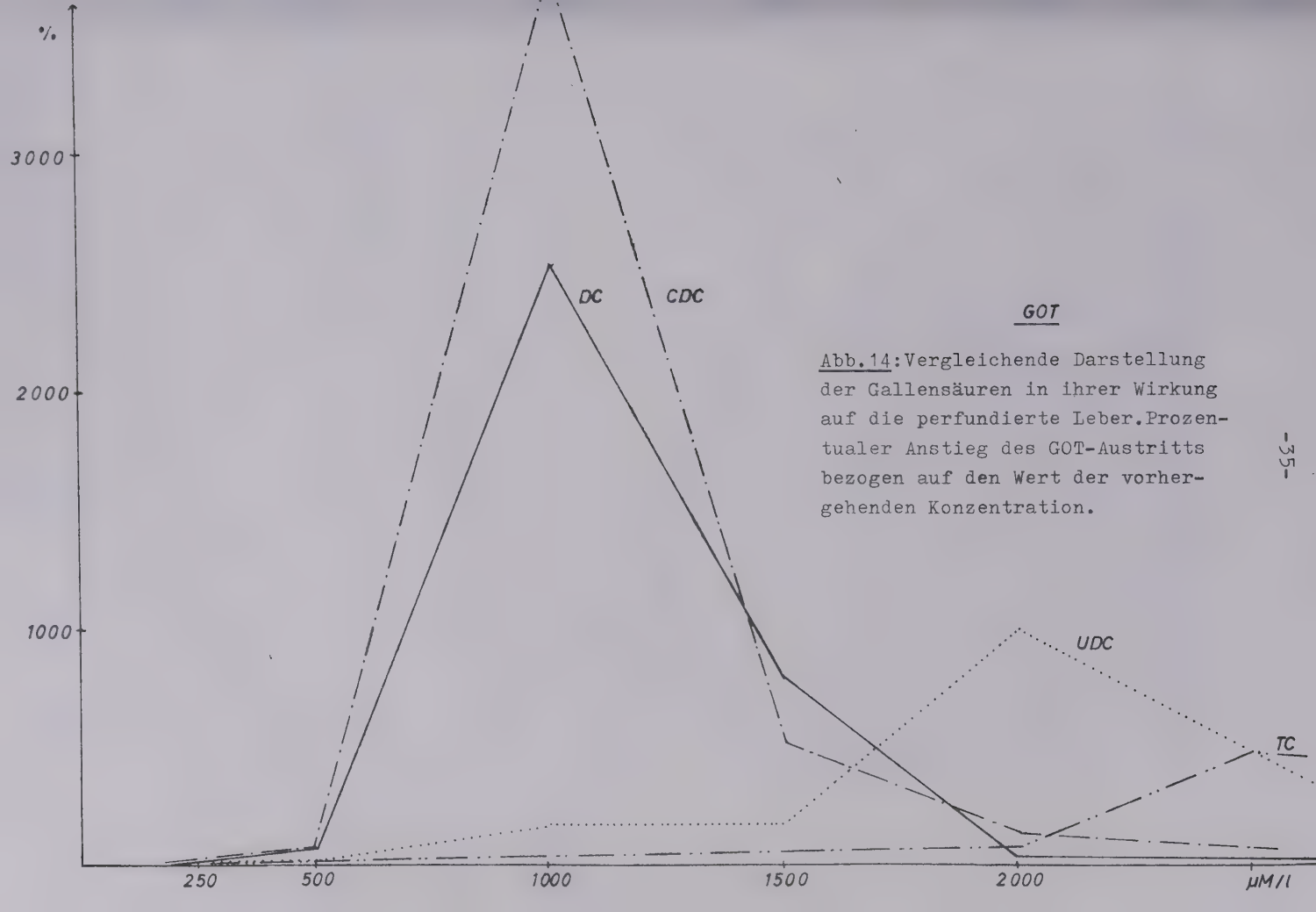
Innerhalb der Gruppe unterschieden sich CDC und DC weder im Schwellenwert noch im Verlauf voneinander, wohingegen der Schwellenwert von TC etwas höher als bei UDC lag, nämlich zwischen 2000 und 2500µM/l statt bei 2000µM/l.

Bei der graphischen Darstellung des prozentualen Aktivitätsanstiegs bei einer bestimmten Konzentration gegenüber der jeweils vorhergehenden Konzentration kommen

die Gemeinsamkeiten und Unterschiede der beiden Gruppen gut zur Geltung (Abb.14 u. 15):Der Schwellenwert der Gallensäuren entspricht jeweils dem Scheitelpunkt der Kurve.Die Steilheit des Anstiegs der Kurven der starken Gallensäuren DC und CDC bei 1000uM/l und ihr starker Abfall zeigen die plötzlich einsetzende toxische Wirkung dieser Gallensäuren.Bei den schwachen Gallensäuren TC und UDC spricht der sehr viel flachere Kurvenverlauf mit anschliessendem langsamen Abfall für eine allmählich und später einsetzende Schädigung bei steigenden Konzentrationen.

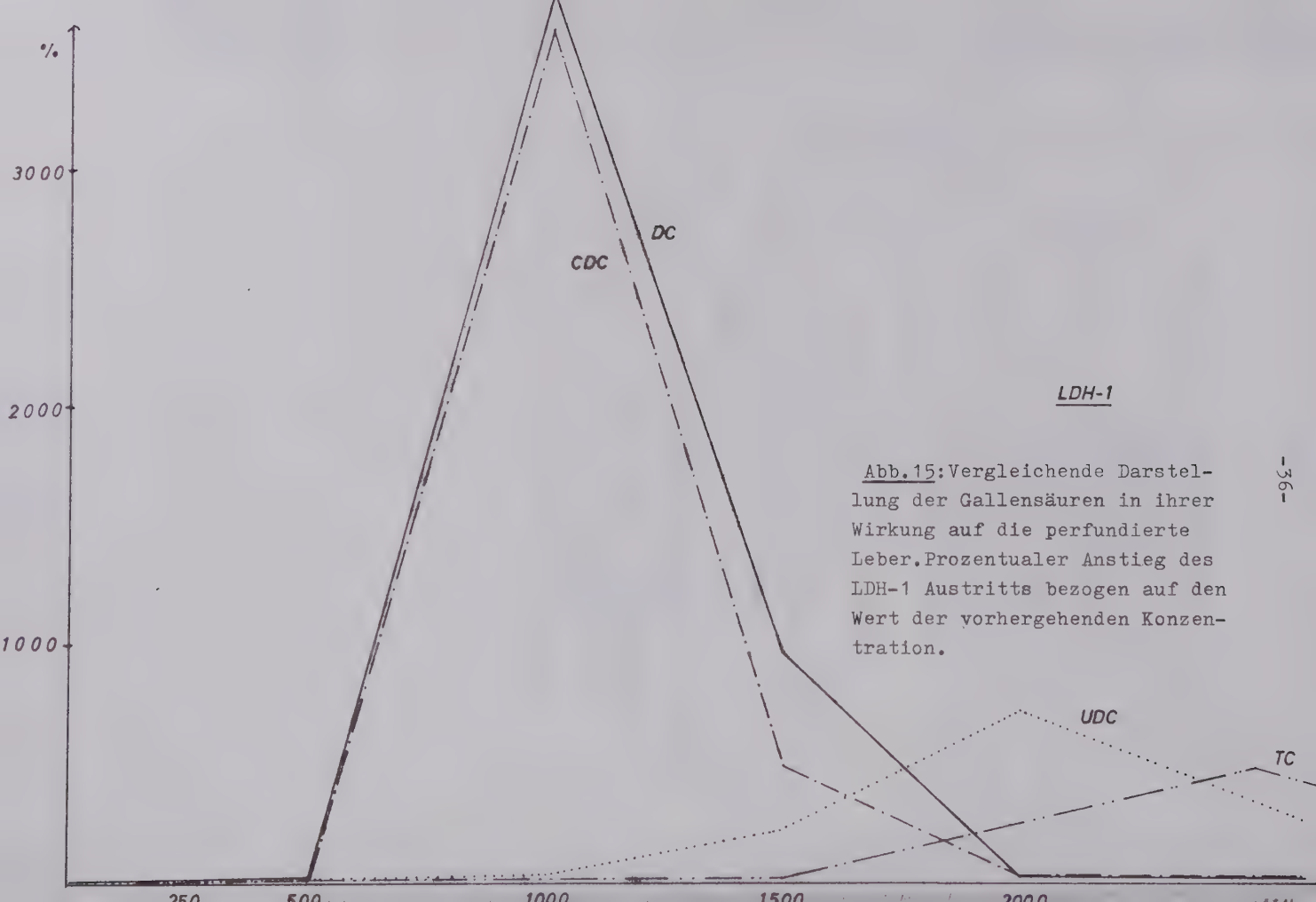
		Gruppe I		Gruppe II	
		CDC	DC	UDC	TC
I	CDC	-	k.S.	S.	S.
	DC	k.S.	-	S.	S.
II	UDC	S.	S.	-	k.S.
	TC	S.	S.	k.S.	-

Tab.3: Vergleich der beiden Gallensäurengruppen.
S. = signifikante Unterschiede
k.S. = keine signifikanten Unterschiede



GOT

Abb.14: Vergleichende Darstellung der Gallensäuren in ihrer Wirkung auf die perfundierte Leber. Prozentualer Anstieg des GOT-Austritts bezogen auf den Wert der vorhergehenden Konzentration.



LDH-1

Abb.15: Vergleichende Darstellung der Gallensäuren in ihrer Wirkung auf die perfundierte Leber. Prozentualer Anstieg des LDH-1 Austritts bezogen auf den Wert der vorhergehenden Konzentration.

5.2.2. Langzeitperfusion ohne Gallensäuren (Abb.16)
Die Langzeitperfusion der Leber ohne Zugabe von Gallensäuren zeigte lediglich einen geringfügigen linearen Anstieg der Enzyme im Überstand (Abb.16,Tab.15).

Die Versuchsdauer betrug 105 Minuten,was der Dauer einer Perfusion mit Gallensäure entspricht.Nach dieser Zeit lag die gemessene Enzymaktivität so niedrig,dass sie weit unterhalb der Schwellenkonzentration der einzelnen Gallensäuren lag.Dies spricht für die Güte der verwendeten Perfusionstechnik und legt den Schluss nahe,dass allein die jeweilige Gallensäure und nicht die Perfusion an sich für den gemessenen Enzymaustritt verantwortlich war.

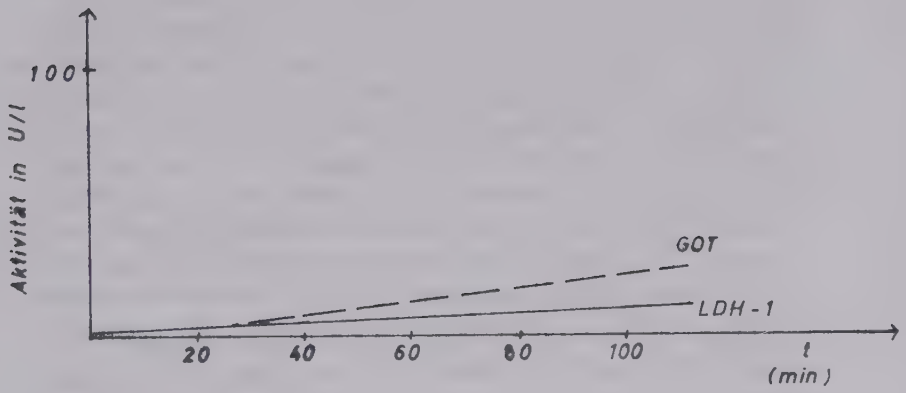


Abb.16: Enzymaustritt bei Langzeitperfusion (t=105') der Leber ohne Gallensäure.(Tab.15)

6. DISKUSSION

6.1. Zur Methode der Messung des Enzymaustritts als Indikator für eine Membranschädigung

In diesen Versuchen ging es um die Frage nach der unterschiedlichen Toxizität der Gallensäuren in bezug auf die Zellmembran. Ausgehend von der Vorstellung, dass die Gallensäuren eine Störung im Membrangefüge, insbesondere ein Leckwerden der Plasmamembran und damit das Austreten von zellständigen Enzymen verursachen, wurde, wie oben erwähnt (2.3.), als Indikator für das Ausmass der Membranschädigung der Anstieg zellständiger Enzyme im Überstand gewählt. Dazu wurden die Enzyme LDH-1 und GOT herangezogen, da diese gegenüber den Einwirkungen der Gallensäuren relativ stabil waren (64) und da sich die Enzyme auch in ihrem Molekulargewicht nicht wesentlich voneinander unterscheiden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Enzyme auf dem gleichen Weg die Zelle verlassen, zumal ihr Verhältnis im Überstand ihrem Verhältnis zueinander in der Zelle entspricht (69). LDH-1 gehört zu den cytoplasmatischen Enzymen der zellulären Enzymausstattung, die bereits austreten können, bevor die Zellorganellen zerstört sind und weist mit einer Halbwertszeit von 113 $\pm$ 60 Stunden die grösste Halbwertszeit aller Enzyme auf.

Dagegen ist GOT in der Leberzelle sowohl im Zytoplasma gelöst als auch gebunden in den Mitochondrien vorhanden.

Es stellt sich dabei jedoch die Frage, ob der in diesen Versuchen gemessene Enzymaustritt tatsächlich auf eine direkte Schädigung der Membran zurückgeführt werden kann oder ob es sich nicht eher primär um eine Störung des Zellstoffwechsels handelt, die sekundär zu einem Enzymaustritt führt. Dabei käme vor allem eine Störung im Energiehaushalt in Betracht. Beobachtungen dieser Art, dass also die Gallensäuren die Fähigkeit besitzen, mitochondriale Stoffwechselprozesse zu beeinträchtigen, werden

in der Literatur beschrieben.Lee und Whitehouse (41) beschrieben in ihrer Arbeit eine vollständige Entkopplung der oxydativen Phosphorilierung in isolierten Rattenmitochondrien nach 30-minütiger Inkubation mit 500µM/l DC bzw. CDC.

Es wäre also denkbar,dass die Zelle durch den infolge der Gallensäurewirkung entstandenen Energiemangel nicht mehr in der Lage ist,Schäden in der Plasmamembran zu reparieren.Die Freisetzung intrazellulärer Enzyme und anderer Zellbestandteile wäre dann die Folge.

Bei ähnlichen Konzentrationen,wie Lee und Whitehouse sie in ihrer Arbeit verwendeten,nach 500µM/l (CDC - isolierte Zellen) bzw. 1000µM/l (CDC-,DC-Perfusion;DC-isolierte Zellen) wurde in dieser Arbeit ein signifikanter Anstieg von GOT und LDH-1 im Überstand beobachtet.Doch lässt sich dieser wahrscheinlich nicht auf eine unmittelbare Beeinflussung der Mitochondrien zurückführen;denn die ins Zellinnere gelangten Gallensäuren werden auf Grund ihrer hohen Affinität zu lipophilen Substanzen zum grössten Teil an Lipide und lipophile Anteile von Proteinen gebunden (10,19),so dass sie in diesen verwendeten Konzentrationen wahrscheinlich nicht in freier Form ungehindert zu den Mitochondrien gelangen können.Der Energiestoffwechsel wird daher mit grosser Wahrscheinlichkeit erst bei sehr viel höherer Konzentration gestört werden.

Auch Liersch und Hesse (45) kommen in ihrer Arbeit zu dem Ergebnis,dass dieser von Lee und Whitehouse in vitro nachgewiesene toxische Effekt der Gallensäuren auf den Mitochondrienstoffwechsel für das intakte Organ nicht zuzutreffen scheint.

Die Entkopplung der oxydativen Phosphorilierung dürfte demnach ebenfalls auf die Zerstörung der Mitochondrienmembran durch die Gallensäuren zurückzuführen sein. Ausserdem haben Untersuchungen ergeben,dass bei einer Hemmung der oxydativen Phosphorilierung die Glykolyse allein genügt,um einen stärkeren Enzymaustritt zu ver-

hindern,vorausgesetzt,dass ausreichende Glykogenreserven bzw. Glukose vorhanden sind (68,70).

Es ist also viel eher wahrscheinlich,dass es sich um eine direkte Wechselwirkung der Gallensäuren mit der Zellmembran handelt,zumal sie mit dieser als erstes in Berührung kommen.

Im übrigen ist es bekannt,dass es sowohl bei extra- als auch bei intrahepatischer Cholestase zu Veränderungen an der Membran - insbesondere der kanalikulären Membrankommt:U.a. nimmt die Zahl der Mikrovilli ab,die Aktivität der Membranenzyme verändert sich,es kommt zu einer Schädigung der kontraktilen Zellelemente und zu einer Auflockerung der tight-junctions (37) (Insbesondere nimmt die Aktivität der Na-K-ATPase ab,der beim transmembranalen Transport der Gallensäuren eine besondere Rolle zugeschrieben wird.).Ausserdem können in den Gallenthromben als auch im peripheren Blut Membrankomponenten nachgewiesen werden (6,13).
Dies alles spricht dafür,dass die Gallensäuren in höheren Konzentrationen einen zerstörerischen Einfluss auf die Plasmamembran der Leberzelle ausüben.Auch werden hämolytische Eigenschaften der Gallensäuren von verschiedenen Autoren beschrieben (5,13,59).Dabei scheinen die Gallensäuren,besonders Mono- und Dihydroxygallensäuren, eine hohe Affinität für Phospholipide und Cholesterin in der Membran zu besitzen (10,19).DC führt nach Inkubation mit präparierter Plasmamembran zu einer vollständigen Zerstörung der Membranorganisation,während TC auf Grund seines hydrophileren Charakters trotz Herauslösung grosser Mengen von Lipiden und Proteinen noch eine membranähnliche Morphologie hinterlässt (19).

6.2. Inkubation isolierter Hepatozyten mit CDC und DC

Die Gallensäuren,die sich bei in vitro Versuchen als die am stärksten wirksamen Enzyminhibitoren erwiesen hatten (64),entfalteten auch an intakten Zellen eine starke toxische Wirkung.

Bei Erreichen der Schwellenkonzentration von 1000µM/l verursachte DC einen starken Enzymaustritt nach 15 Minuten Inkubationszeit.Der Absolutwert des Enzyms GOT lag immer über dem von LDH-1,da mehr GOT als LDH in der Leberzelle vertreten ist (69).Abgesehen davon wiesen die Aktivitäten der beiden Enzyme im Überstand starke Ähnlichkeiten auf,was dafür spricht,dass sie die Zelle in ähnlicher Weise verlassen.Nach 30 minütiger Inkubation bei einer Konzentration von 1500µM/l DC wurde ein Maximalwert erreicht,der auch bei weiterer Steigerung der Gallensäurekonzentration nicht wesentlich erhöht werden konnte (Abb.6 u.7).Dieses Plateau bei hoher Konzentration kann dadurch erklärt werden,dass die Zellen bereits soweit geschädigt wurden,dass sie ihren gesamten Enzymgehalt an den Extrazellulärraum abgegeben haben. Eine weitere Konzentrationssteigerung hätte keine Zunahme der Enzyme im Überstand mehr zur Folge.Dafür spricht die Tatsache,dass bei lichtmikroskopischer Untersuchung eine völlige Zerstörung der Zellen beobachtet wurde.Nur Zellorganellen wie Mitochondrien und Nuclei konnten noch als solche identifiziert werden.Der verhältnismässig steile Anstieg des Enzymaustritts im Bereich von 1000µM/l deutet auf eine plötzliche,massive Schädigung der Zellmembran durch DC hin.Besonders deutlich ist dies auch in Abb.9 zu erkennen.

Demgegenüber schien die Membranschädigung durch CDC eher allmählich zu verlaufen (Abb.6 u.7).Obwohl die schädigende Wirkung bei Inkubation mit CDC früher einsetzte als bei einer DC-Schwellenkonzentration von 500µM/l, war der Austrittsverlauf von GOT und LDH-1 hier weit weniger steil als bei DC (Abb.8).

Abgesehen von der niedrigeren Schwellenkonzentration und dem flacheren Anstieg der Enzymaktivität ist der Austrittsverlauf der Enzyme bei CDC und DC grundsätzlich ähnlich.Auch hier ist die Annäherung an einen Maximalwert bei höherer Konzentration so zu verstehen,dass

dieser Maximalwert den Punkt darstellt,an dem die Hepatozytenmembran bereits soweit zerstört wurde,dass die Enzyme bereits zum grössten Teil die Zelle verlassen konnten.Wie zu erwarten,stimmen die Maximalwerte der Enzymaktivitäten von GOT und LDH-1 in beiden Inkubationsversuchen überein,da einheitliche Zellpopulationen verwendet wurden und da die Aktivitäten dem maximalen Gehalt der Zellen an GOT und LDH-1 entsprechen.

Eine toxische Wirkung auf die Zellmembran konnte also bei beiden Gallensäuren CDC und DC beobachtet werden. Obwohl sie sich in der Schwellenkonzentration und der Steilheit des Enzymaustritts unterschieden,erreichten sie interessanterweise beide bereits bei der Konzentration von 1500µM/l die maximale toxische Wirkung.

6.2.1. Wirkungsmechanismus der Membranschädigung

Es ist wahrscheinlich,dass es sich bei dieser toxischen Wirkung auf die Zellmembran um hydrophobe Wechselwirkungen der Gallensäuren CDC und DC mit lipophilen Bestandteilen in der Membran handelt.Auf Grund ihrer Struktur (vgl. Abb.17) sind sie wahrscheinlich in der Lage,sich mit ihrem hydrophoben Ringsystem B-C-D (vgl. 2.1.1.) an lipophile Substanzen (z.B. Cholesterin und andere Lipide) zu heften,mit diesen Mizellen zu bilden und sie so aus der Membran heraus zu lösen.Bei genügend hoher Gallensäurekonzentration ist die Zelle dann nicht mehr in der Lage,diese Substanzdefekte in der Membran auszugleichen.Die Membran wird leck,und Zellbestandteile können in den Extrazellulärraum übertreten.

Der bei Cholestase oft beobachtete Mikrovillischwund (6,13,37) kann damit in der Weise interpretiert werden, dass die Zelle das aus der Membran herausgelöste Material nicht schnell genug ersetzen und die entstandenen Löcher nur durch Verkleinerung ihrer Oberfläche verschliessen kann.Zum anderen könnte dies auch einen Schutzmechanismus der Zelle bei längerdauernder Cholestase darstellen,da sie bei Verkleinerung ihrer Ober-

fläche den schädigenden Gallensäuren weniger Angriffsfläche bietet.Da man bei Cholestase in den Gallencanaliculi und im peripheren Blut Plasmamembranbestandteile nachweisen kann (6,13),ist es jedoch unwahrscheinlich, dass die Abnahme der Mikrovilli an der kanalikulären Membran nur als ein beabsichtigter Schutzmechanismus zu verstehen ist.Möglicherweise spielen beide Gesichtspunkte eine Rolle.

6.2.2. Zur Methode der Inkubation mit isolierten Zellen

Die verwendeten Gallensäurekonzentrationen (bis 1500µM/l) liegen zwar viel höher als diejenigen,die normalerweise im Leberblut (2-5µmol/l) (29) zu finden sind,aber weitaus niedriger als die in der Lebergalle vorkommenden Konzentrationen (bis 14g/l) (67).Unter physiologischen Bedingungen sind die Hepatozyten also in der Lage,einer Konzentration von 14g/l Gallensäuren an ihrer kanalikulären Membran standzuhalten.Allerdings setzt sich die Lebergalle anders zusammen als das hier verwendete Gallensäureinkubationsmedium (siehe Tab.2).Möglicherweise bilden die Gallensäuren in der Lebergalle mit den Lipiden (z.B. Cholesterin) Mizellen und sind somit nicht mehr oder nur noch in geringem Masse fähig,hydrophobe Wechselwirkungen mit der Membran einzugehen.

Tab.1: Lebergalle (67)

Wasser	95-98%
Gallensalze, total	0,65-1,4g%
Bilirubin	12-135mg%
Cholesterin	80-180mg%
Fettsäuren	160-410mg%
Proteine	140-270mg%

Ausserdem liegen die Gallensäuren physiologischerweise fast ausschliesslich in konjugierter Form vor (Tauro-,

Glyko-).Konjugierte Gallensäuren haben jedoch einen stärker hydrophilen Charakter und sind daher viel weniger membranschädigend (10).Zum anderen handelt es sich in der Lebergalle um ein Gemisch aus mehreren Gallensäuren:

40% Tauro-(Glyko-) Cholsäure
40% Tauro-(Glyko-) Chenodesoxycholsäure
20% Tauro-(Glyko-) Desoxycholsäure
+ ein geringer Prozentsatz an konjugierter und unkonjugierter Lithocholsäure.

Dabei soll die konjugierte Cholsäure auf Grund ihres hydrophilen Charakters eine schützende Funktion haben (10,40). Zu berücksichtigen ist ferner,dass die Hepatozyten im intakten Organ den Gallensäuren nur an der kanalikulären Membranseite ausgesetzt sind,die in etlichen Eigenschaften von der sinusoidalen Membran abweicht (54,72).In diesem Versuch dagegen wurden sie an allen Seiten von Gallensäuren umgeben.Die Ergebnisse in diesem Versuch sind also nicht unmittelbar auf physiologische Verhältnisse übertragbar.

6.3.1. Leberperfusion

Wenn also die Leberzellabschnitte,die normalerweise nicht mit der Lebergalle in Berührung kommen,gegenüber den Einflüssen von Gallensäuren besonders empfindlich sind,dann müsste die minimale schädigende Konzentration bei Versuchen mit dem intakten Zellverband weitaus höher liegen (vgl. maximale Konzentration der Gallensäuren von 14g/l in der Lebergalle).Um diese Frage zu klären,wurden anschliessend Leberperfusionsversuche mit DC und CDC durchgeführt.

Da ausserdem in der Literatur beschrieben wird,dass TC einen die Zellmembran schützenden Effekt gegenüber der Detergentienwirkung von LC aufwies und allein ihres hydrophilen Charakters wegen die Membran weniger stark angreift als DC (10),wurden zudem noch weitere Leberperfusionen mit TC durchgeführt.Zusätzlich wurde noch UDC

untersucht,das ebenso wie CDC seit einiger Zeit in der Gallensteintherapie Verwendung findet.Es wurden zwei Perfusionen pro Gallensäure durchgeführt,bei CDC drei.

Zu Anfang des Versuches wurde jeweils mit gallensäurefreien Medium (Tab.2) 15 Minuten lang vorperfundiert, um die Stabilisierung des Stoffwechselgleichgewichts abzuwarten,die Vitalität der perfundierten Leber zu testen und um einen Bezugswert für die nachfolgende Perfusion mit Gallensäuren zu erhalten.Um Verfälschungen der Versuche infolge operationsbedingter Vorschädigung der Leber zu vermeiden,wurden die Versuche jeweils nur dann gewertet,wenn die Enzymaktivität der Probe in den ersten 15 Minuten ohne Gallensäuren zwischen 0-5U/l bei LDH-1 und 0-10 U/l bei GOT betrug.Dadurch konnte man sicher gehen,dass der anschliessende Anstieg der Enzymaktivität im Überstand auf Einwirkung der Gallensäuren während der Perfusion zurückzuführen war.

Da die Leber jeweils 105 Minuten lang perfundiert wurde, musste ausserdem ausgeschlossen werden,dass eine länger dauernde Perfusion ohne Gallensäuren in unserem Versuchsaufbau zu einer ähnlichen Schädigung der Leber wie die Perfusion mit Gallensäuren führte.Der geringe Enzymaustritt bei der Langzeitperfusion ohne Gallensäuren (Abb.16) zeigte,dass der Enzymaustritt bei den Versuchen mit Gallensäuren nur auf deren schädigende Wirkung zurückzuführen war.

6.3.2. CDC- bzw. UDC-Gallensteintherapie

Seit der Entdeckung,dass CDC und ihr 7-ß-Epimer UDC Cholesteringallensteine aufzulösen vermögen,wird diesen beiden Gallensäuren in der Gastroenterologie besondere Aufmerksamkeit geschenkt (1,4,12,34,39,49,58,60,78,83). Die bisherigen Versuche stützten sich vor allem auf klinische Feldstudien und Tierversuche;so stellten Leuschner et al. (44),Fedorowski et al. (20) und Stiehl et al. (79) fest,dass CDC eine stärkere lebertoxische

Wirkung als UDC besitzt (stärkerer Anstieg der Serumtransaminasen und licht- und elektronenmikroskopisch sichtbare Schäden).

Fedorowski et al. fanden in Versuchen mit Rhesusaffen, dass CDC in einer Dosis von 40 und 100mg pro Tag und kg Körpergewicht im Gegensatz zu UDC einen deutlichen Anstieg der Serumtransaminasen hervorruft.Allerdings können die Versuche nicht ohne weiteres auf menschliche Verhältnisse übertragen werden,da beim Menschen die im Darm aus CDC gebildete lebertoxische LC fast vollständig sulfatiert wird und nur 20% der Menge beim Rhesusaffen beträgt.Leuschner et al. fanden in Übereinstimmung mit Miyai,dass CDC auch bei der Rattenleber LC-unabhängige Schäden hervorruft,da LC bei der Ratte nicht nur sulfatiert,sondern auch 6-ß-hydroxiliert wird und so seine toxische Wirkung verliert.

Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterinsynthese,die HMG-CoA-Reductase,soll sowohl durch UDC als auch durch CDC in ihrer Aktivität reduziert werden. Dadurch kommt es zur Cholesterinuntersättigung der Galle und infolgedessen zur Senkung der Lithogenität (50).Bereits ausgefallenes Cholesterin kann nun allmählich wieder in Lösung gehen.Interessanterweise soll UDC bei gleicher Dosierung wie CDC (13-18mg/kg u. Tag) den Cholesteringehalt der Galle signifikant stärker senken als CDC (80).Ausserdem nimmt nach Gabe von UDC nur diese Gallensäure in der Galle zu,während nach Behandlung mit CDC neben dieser auch LC und LC-Sulfat ansteigen sollen (80).Transaminasenerhöhung im Serum und andere Nebenwirkungen,wie Diarrhoe,wurden ebenfalls nur nach CDC-Gabe und nicht nach UDC-Gabe in klinischen Studien beobachtet (43,80).

Zahlreiche weitere Untersuchungen bezüglich der Hepatotoxizität dieser Gallensäure wurden angestellt (20, 21,44,55,79).Dabei fand sich nach oraler Gabe von, bzw. Perfusion mit,CDC erhebliche morphologische Ver-

änderungen der Leber mit vereinzelten Zellnekrosen und eine generelle Dysorganisation von Kern und Zytoplasmaorganellen.Die Plasmamembran war kanalikulär und sinusoidal verändert,das rauhe endoplasmatische Reticulum fragmentiert,die Mitochondrien deformiert und der Zellkern pyknotisch.Die Canaliculi wiesen zum Teil starke Dilatationen auf und der Mikrovillibesatz war vermindert (55).Leuschner et al. beschrieben sogar,dass Ratten nach oraler Gabe von 1000mg/kg u. Tag CDC nach einigen Tagen verstarben (44).Demgegenüber verursachte UDC selbst in hohen Dosen kaum Veränderungen an der Leberzelle.Es zeigte sich weder ein Transaminasenanstieg, noch wurden morphologische Alterationen im Leberparenchym beobachtet (20,44,79).

Von vielen Autoren werden diese Unterschiede in der Hepatotoxizität auf den unterschiedlichen Metabolismus der beiden Gallensäuren zurückgeführt (20,44).CDC soll infolgedessen auf Grund ihres bakteriellen Abbauproduktes LC hepatotoxisch wirken,da sie im Gegensatz zu UDC zu einer Erhöhung der LC in der Galle führt (80).Andererseits wird berichtet,dass die Zunahme von unsulfatierter LC nach CDC-Gabe zwar signifikant,aber immer noch zu gering ist,um derartige morphologische Veränderungen herbeizuführen (79).Leuschner et al. beschrieben sogar eine Abnahme von LC im Homogenat nach Gabe von CDC,was wahrscheinlich auf einer Induktion der Sulfatierung beruht.

Alles in allem scheint die Frage nach der Ursache der unterschiedlichen Toxizität von CDC und UDC noch nicht eindeutig geklärt zu sein.In dieser Arbeit wurde daher ein Versuchsaufbau gewählt,bei dem die Verstoffwechselung von CDC zu LC mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden konnte,denn bei der Perfusion der isolierten Leber kann der bakterielle Abbau von CDC zu LC keine Rolle spielen.Lediglich die unterschiedliche Struktur von UDC und CDC (vgl. Abb.17)

kann für die voneinander abweichenden Wirkungen,die im folgenden besprochen werden,verantwortlich gemacht werden.

6.3.3. Perfusion mit CDC bzw. UDC

Während CDC bei einer Konzentration von 1000µM/L bereits nach 5 Minuten Einwirkungsdauer zu einem signifikanten und sehr steil verlaufenden Enzymaustritt führte,zeigte UDC erst bei 2000µM/l eine Wirkung.Wie bei den Versuchen mit isolierten Hepatozyten näherte sich der Enzymaustritt bei CDC (Abb.11) in höheren Konzentrationen einem Maximalwert,der anzeigte,dass alle von den durchströmten Lebersinusoiden erreichbaren Zellen maximal geschädigt wurden und ihren gesamten Enzymgehalt an den Extrazellulärraum abgegeben hatten.In diesem Zustand war die vorher braune Leber makroskopisch entfärbt (hellgelb), während das Perfusionsmedium bräunlich wurde.

Bei verschiedenen Lebern wichen die Maximalaktivitäten von GOT und LDH-1 voneinander ab,was nicht allein durch die unterschiedlichen Lebergewichte (9 bzw. 10g) zu erklären ist.Da diese Divergenz der Maximalwerte erst bei höheren Konzentrationen signifikant eintrat,kann dies möglicherweise die Folge einer Verkleinerung der perfundierten inneren Leberoberfläche infolge Verlegung von Kapillaren durch Zellfragmente geschädigter Hepatozyten sein.Die Verkleinerung der inneren Oberfläche durch Blutgerinnsel kann ebenfalls nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.Da die Kurvenverläufe von GOT und LDH-1 bis auf die Maximalwerte nahezu identisch sind (Abb.11),kann man auch hier vermuten,dass die Enzyme in ähnlicher Weise die Zelle verlassen (vgl. 6.2.).

Im Vergleich dazu war bei UDC nicht nur die Schwelle zu höheren Konzentrationen hin verschoben (Abb.12); auch der Aktivitätsanstieg verlief viel flacher als bei CDC,so dass bei der höchsten verwendeten Konzen-

tration von 3000µM/l eine Annäherung an einen Maximalwert noch nicht stattgefunden hatte.Der Wert von UDC bei 3000µM/l entspricht etwa dem,der bei der Perfusion mit CDC bereits bei einer Konzentration von 1000µM/l erreicht wurde.Dies lässt darauf schliessen,dass selbst bei 3000µM/l UDC noch nicht alle Zellen geschädigt waren.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Autoren (20,21,44,55,79) zeigte sich also auch in diesen Versuchen,dass UDC weitaus weniger toxisch wirksam war als CDC.Wie oben bereits erwähnt,konnte die Verstoffwechselung von CDC zu LC infolge des Fehlens der bakteriellen Darmflora ausgeschlossen werden.

Die stärkere Toxizität von CDC muss daher auf den noch verbleibenden Unterschied zwischen CDC und UDC zurückgeführt werden,nämlich die Stellung der OH-Gruppe am C_7-Atom (Abb.17).Durch die cis-Orientierung der OH-Gruppe von UDC verliert das B-C-D Ringsystem an Hydrophobizität.Dadurch scheint UDC weniger in der Lage zu sein,mit lipophilen Substanzen der Zellmembran in Wechselwirkung zu treten und diese aus der Plasmamembran herauszulösen.

6.3.4. Perfusion mit DC

Der Verlauf des Enzymaustritts bei der DC-Perfusion (Abb.10) unterscheidet sich nicht wesentlich von dem bei CDC. Weder im Anstieg des Enzymaustritts noch in der Schwellenkonzentration (beide bei 1000µM/l) sind signifikante Unterschiede festzustellen.Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen bei der Inkubation von isolierten Hepatozyten,was möglicherweise auf die methodischen Unterschiede zurückzuführen ist.Die Verschiedenheit der Maximalwerte beruht,wie oben bereits erläutert,darauf, dass zum einen verschiedene Lebern unterschiedlichen Gewichts verwendet wurden und zum anderen möglicherweise während der Perfusion Kapillaren durch Zelldetritus verlegt wurden (vgl. 6.3.3.).

CDC und DC scheinen sich nach diesen Ergebnissen also in ihrer toxischen Wirkung auf die Membran kaum voneinander zu unterscheiden.In Anbetracht der Tatsache,dass die Lebergalle Gallensäuren in einer Konzentration von 14g/l enthält,ohne dass Schäden beobachtet werden,wurde erwartet,dass eine Schädigung der Zellen im Zellverband erst bei sehr viel höherer Konzentration eintreten werde, als dies bei den isolierten Hepatozyten beobachtet worden war.Wie aus den Abbildungen 10 und 11 zu entnehmen ist, lag die Schwellenkonzentration bei der Perfusion jedoch nicht viel höher (1000µM/l) als bei den isolierten Zellen (500-1000µM/l).Es handelt sich also nur um geringfügige Unterschiede,die eventuell dadurch zu erklären sind,dass eine Zelle im Verband nur an einer Seite den Gallensäuren ausgesetzt ist und dadurch etwas länger in der Lage ist,die aus der Membran herausgelösten Substanzen zu ersetzen.

6.3.5. Perfusion mit TC

TC erwies sich demgegenüber als weit weniger membrantoxisch.Der Enzymaustritt (Abb.13) ist eher mit dem von UDC vergleichbar.Auch hier zeigt er einen nur sehr flachen Anstieg,und eine maximale Zellschädigung wie bei CDC oder DC ist nicht zu erkennen.Wie bei UDC sind auch hier bei einer Konzentration von 3000µM/l noch lange nicht alle Zellen geschädigt.Da TC einen im Vergleich zu UDC stärker ausgeprägten hydrophilen Charakter besitzt - durch seine 3. OH-Gruppe und Konjugierung mit Taurin -,liegt die Schwellenkonzentration hier auch erwartungsgemäss noch etwas höher als bei UDC (2000-2500µM/l).

6.3.6. Beziehung zwischen dem Wirkungsmechanismus der Zellschädigung und der Struktur der verwendeten Gallensäuren

Bereits Berliner und Schoenheimer (5) stellten im Jahre 1938 eine Beziehung zwischen den hämolytischen Eigenschaften von Gallensäuren und anderen Steroiden und

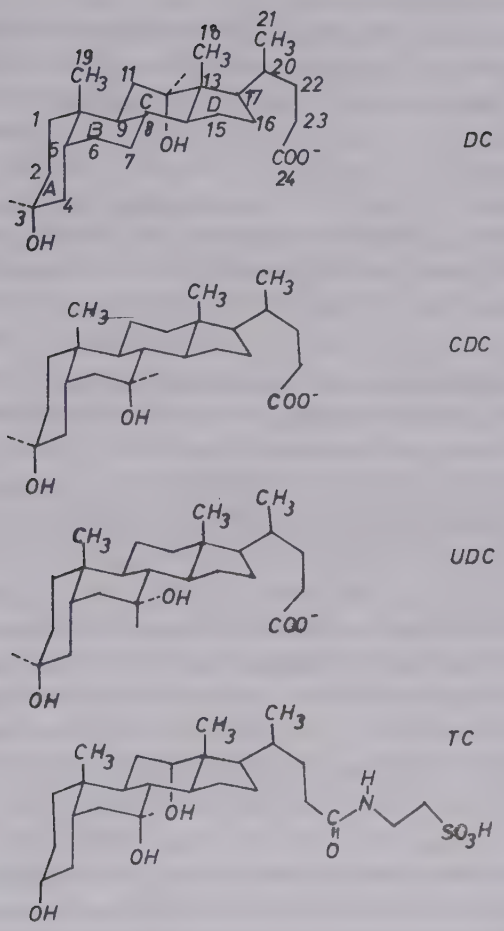


Abb.17: Perspektivische Darstellung der verwendeten Gallensäuren

deren molekularer Struktur her.Sie kamen dabei zu dem Ergebnis,dass ein Steroid nur dann hämolytisch wirksam sein kann,wenn die Ringe A und B in cis-Konfiguration miteinander verknüpft sind und eine Hydroxylgruppe in

3-α-Stellung vorhanden ist.Ausserdem fanden sie heraus, dass u.a. CDC und DC (neben LC) stark hämolytische Eigenschaften besitzen,während Cholsäure und UDC nur schwach zu hämolysieren vermochten,ohne jedoch diese Unterschiede näher erklären zu können.Diese Ergebnisse stimmen mit denen in dieser Arbeit überein,nur dass in dieser Arbeit statt Erythrozyten Hepatozyten - isoliert und im Zellverband - verwendet wurden.Es ist sehr wahrscheinlich,dass die in (5) beobachtete Hämolyse ebenfalls auf einer primären Zerstörung der Erythrozytenmembran beruht (vgl. 5.1.).

Nach (10,19) beruht die Membranwirkung von DC,wie bereits erwähnt,wahrscheinlich darauf,dass DC mit Cholesterin und anderen lipophilen Bestandteilen der Membran Mizellen bildet und diese so herauslöst.

CDC unterscheidet sich von DC nur in der Stellung der zweiten Hydroxylgruppe,die sich bei CDC am C_7- statt am C_{12}-Atom befindet.Da auch diese OH-Gruppe am C_7-Atom vom apolaren Ringsystem wegweist,ist CDC ebenfalls in der Lage, hydrophobe Wechselwirkungen mit entsprechenden Membranbestandteilen einzugehen.Daher zeigen die beiden Gallensäuren CDC und DC auch ein ähnliches Verhalten in diesen Versuchen.

Interessanterweise reicht die alleinige OH-Isomerisierung am C_7-Atom von CDC aus,um die relativ starke Membranwirkung von CDC erheblich abzuschwächen.UDC unterscheidet sich nämlich nur durch die Stellung dieser einen OH-Gruppe von CDC.Durch die cis-Orientierung reicht diese relativ polare Hydroxylgruppe in den apolaren Bereich der Ringe B-C-D hinein und mindert dadurch wahrscheinlich die Hydrophobizität dieses Systems.Möglicherweise beruht die geringe Tendenz von UDC,mit der Membran zu reagieren bzw. diese zu schädigen,darauf,dass es infolge der 7-ß-OH-Stellung weniger hydrophoben Charakter besitzt.

TC wird durch säureamidartige Verknüpfung mit Taurin stärker hydrophob,worauf ihre in dieser Arbeit beobachtete geringe Membrantoxizität zurückzuführen sein dürfte.Dies

stimmt mit den Ergebnissen von Coleman und Holdsworth (10) überein,die eine im Vergleich zu DC geringere Wirkung von TC auf Plasmamembranen fanden (geringere Zerstörung der Membranorganisation,geringere Lösung von Membrankomponenten).

6.3.7. Zur Methode der Perfusion

Die Methode der stufenweisen Konzentrationssteigerung ist nicht zur Erlangung von Absolutwerten geeignet,für den Vergleich der Toxizität der Gallensäuren untereinander ist sie jedoch angebracht.

Mit Hilfe der Leberperfusion kann man die physiologischen Verhältnisse nicht ganz naturgetreu nachvollziehen,da sich die Gallensäuren in höherer Konzentration normalerweise an der kanalikulären Membran der Leberzellen befinden.Durch die Perfusion wird die zu untersuchende Gallensäure der Zelle jedoch von der sinusoidalen Seite zugeführt.

Es ist bekannt,dass die Lebergalle unter normalen Verhältnissen Gallensäuren bis zu einer Konzentration von 14g/l enthält,ohne dass die Zelle in ihrer Struktur oder ihrem Stoffwechsel beeinträchtigt wird.Bei der Perfusion der Leber mit oben genannten Gallensäuren zeigte sich jedoch bei weitaus geringeren Konzentrationen eine erhebliche Schädigung der Hepatozyten.

Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen,dass die kanalikuläre Membran im Gegensatz zur sinusoidalen über einen speziellen Schutzmechanismus verfügt.Da die Gallensäurekonzentration im Leberblut normalerweise viel geringer ist (2-5µmol/l) (29),kann man nicht erwarten,dass die Leberzelle an der sinusoidalen Seite denselben Schutzmechanismus besitzen,mit anderen Worten,dass der Aufbau der sinusoidalen Membran der gleiche ist wie auf der kanalikulären Seite.

Oder aber es liegt daran,dass die Gallensäuren,die normalerweise den Hauptteil der Galle ausmachen (vor allem

konjugierte Gallensäuren) relativ untoxisch sind bzw. mit den Gallenlipiden untoxische Mizellen bilden.

Es gibt ausserdem Anzeichen dafür,dass sich der sinusoidale Membrananteil,entsprechend seiner Funktion der Aufnahme von Substraten aus dem Blut,von der kanalikulären Membranseite,die mehr sezernierende Funktion hat,unterscheidet (54,72).Diese Polarisierung sinusoidal - kanalikulär beruht dabei wahrscheinlich nicht nur auf der Lage der Zelle im Zellverband,sondern besteht mit grosser Wahrscheinlichkeit in einem unterschiedlichen Aufbau der beiden Membranen.Denn diese Polarität der Zelle soll auch nach ihrer Isolierung aus dem Zellverband erhalten bleiben (72).Ausserdem wird beschrieben,dass sich die Gallensäuren-Carrier auf beiden Seiten voneinander unterscheiden (u.a. in der Hemmbarkeit) (72).Zum anderen soll die Na-K-ATPase vermehrt auf der sinusoidalen Seite zu finden sein, während die Mg-ATPase in der kanalikulären Membran lokalisiert sein soll (54).

Wenn sich also der Aufbau der sinusoidalen Membran von dem der kanalikulären unterscheidet,ist es verständlich, dass geringere Konzentrationen als 14g/l hier bereits eine Schädigung verursachen können.

Andererseits spielt sicherlich auch die von der natürlichen Galle stark abweichende Zusammensetzung des verwendeten Gallensäureinkubationsmedium eine Rolle (siehe Tab. 4).

Vor allem das Fehlen von Cholesterin und anderen Lipiden sowie die Abwesenheit weiterer Gallensäuren (z.B. Cholsäure) mit starker Tendenz zur Mizellenbildung wirken sich wahrscheinlich nachteilig auf die Zellmembran aus, da durch Bildung von Cholesterin-Gallensäuren- bzw. Gallensäuren-Gallensäuren-Mizellen die Zahl der freien mit der Membran reagierenden Gallensäuren-Molekülen reduziert sein würde.Auf Grund dieses Mechanismus vermag z.B. Taurolithocholsäure die Aufnahme von Taurocholsäure in isolierte Leberzellen nicht kompetitiv zu hemmen (72).

Tab.4: Vergleich Lebergalle - Perfusionsmedium

Lebergalle (67)		Medium	
Wasser	95-98g%	pro 1l	Aqua bidest.
Gallensalze (total)	0,65-1,4g%	122	mM NaCl
		5,36	mM KCl
Bilirubin	12-135mg%	0,4	mM $MgSO_4 x 7 H_2O$
Cholesterin	80-180mg%	0,5	mM $MgCl_2 x 6 H_2O$
Fettsäuren	160-410mg%	0,34	mM $Na_2HPO_4 x H_2O$
Proteine	140-270mg%	0,44	mM $KHPO_4$
Cl^-	89-118mval/l	1,0	mM $CaCl_2$
Ca^{++}	3,3-4,1mval/l	5,05	mM Glucose x H_2O
Na^+	131-164mval/l	22,5	mM $NaHCO_3$
K^+	2,6-12,0mval/l		

6.3.8. Übertragbarkeit der Ergebnisse aus den Versuchen mit isolierten Hepatozyten und perfundierten Rattenlebern auf die Verhältnisse in vivo

Der Stoffwechsel der Zelle und damit ihre Funktion im Organismus hängt davon ab,dass die Reaktionen in streng voneinander abgegrenzten Reaktionsräumen (Kompartimenten) ablaufen.Die ordnenden Grundelemente dieser Kompartimentierung stellen die Zellmembranen dar.Eine Aufhebung der Kompartimentierung,z.B. durch Gallensäuren,die mit den Zellmembranen reagieren und diese schädigen,würde zum Untergang der Zelle führen.

Die Bestandteile der Zellmembran sind auf Grund ihrer chemischen Struktur in der Lage,mit den Gallensäuren zu reagieren:

Biologische Membranen bestehen aus Cholesterin (bis zu 25%),Proteinen und Lipiden.Der Hauptteil der Membranlipide besteht aus amphipathischen Molekülen mit zwei hydrophoben Teilen,während die Membranproteine Bindungsstellen für Phospholipide besitzen und Detergentien binden können (82).

Wie in den Versuchen festgestellt wurde,sind die verwendeten Gallensäuren in unterschiedlichen Ausmass in

der Lage,Hepatozytenmembranen zu schädigen.Bei der Übertragung der Ergebnisse mit Rattenlebern auf menschliche Verhältnisse müssen folgende Punkte Beachtung finden:

Es ist ungewiss,ob die Zellmembranen von Rattenhepatozyten ebenso reagieren wie die von menschlichen Hepatozyten.Unter normalen Verhältnissen beträgt die Konzentration von Gallensäuren beim Menschen 0,014g/ml in den Gallengängen und 0,6µg/ml im Blut.Die Konzentration im Blut kann bei akuter Hepatitis bis auf 48µg/ml und bei extrahepatischer Cholestase bis auf ca. 37µg/ml ansteigen (47).In den oben geschilderten Versuchen findet man bei DC und CDC erst bei der 10-fachen Menge der Gallensäuren im Serum bei Hepatitis eine signifikante Membranschädigung.Die Wirkung der Gallensäuren im Serum bei Hepatitis oder Cholestase dürfte auch dadurch abgeschwächt werden,dass die Gallensäuren untereinander oder mit Serumlipiden Mizellen bilden oder durch Bindung an Proteine (z.B. Albumin) abgefangen werden.

Andererseits muss berücksichtigt werden,dass die Schädigung der Hepatozyten in der vorliegenden Arbeit bereits nach sehr kurzer Einwirkungszeit (15') eintrat und dass Absolutwerte auf Grund des Versuchsaufbaus nicht zu erlangen waren.Möglicherweise ist bei längerer Einwirkungsdauer ein toxischer Effekt auch bei sehr viel niedrigeren Konzentrationen zu beobachten,z.B. bei Konzentrationen, wie sie bei Hepatitis bzw. Cholestase (47) im Serum vorliegen.

Die Gallensäurekonzentrationen in den Gallencanaliculi werden bei extrahepatischer Cholestase sehr viel höher liegen als im Blut.Auf Grund der infolge des Gallenstaus langen Verweildauer der Gallensäuren in den Canaliculi ist zu erwarten,dass Gallensäuren mit Membranbestandteilen dadurch wechselwirken,dass freie Gallensäuremonomere mit der Membran reagieren.

Die vergleichende Untersuchung der Gallensäuren CDC und UDC legt den Schluss nahe,dass bei der Therapie von

Cholesteringallensteinen nur UDC verwendet werden sollte. Da der UDC-Spiegel im Serum bei Therapie mit UDC (67µM/l) kaum höher liegt als der CDC-Spiegel bei der CDC-Therapie (50µM/l) und da die CDC-Konzentration im Serum bei mit UDC behandelten Patienten sogar geringer als bei Kontrollpersonen ist (79),sollte UDC auf Grund ihrer geringeren Membrantoxizität verwendet werden.

Schlussfolgerung:
Diese Arbeit legt den Schluss nahe,dass in weiteren Forschungsarbeiten die Auswirkungen verschiedener Gallesäurekombinationen auf synthetisch hergestellte Monolayermembranen untersucht werden sollte.Dies würde weiteren Aufschluss über den primären Angriffspunkt der Gallensäuren liefern und die Frage beantworten,ob nicht erst eine Störung eines subtil ausbalancierten Gleichgewichts zwischen den verschiedenen Gallebestandteilen einzelne Bestandteile toxisch wirken lässt.Ausserdem könnte noch die Wechselwirkung zwischen Gallensäuren und anderen Gallebestandteilen (z.B. Lezithin,Cholesterin) eine Rolle spielen.

7. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen der Gallensäuren DC,CDC,UDC und TC auf isolierte Hepatozyten und perfundierte Rattenlebern untersucht.Als Indikator für die Zellschädigung wurde der Austritt der Zellenzyme LDH-1 und GOT verwendet,da diese Enzyme gegenüber Gallensäurewirkungen relativ unempfindlich waren.

Die unterschiedlich schädliche Wirkung von CDC und ihres 7ß-Epimers,der UDC,wie sie vor allem in klinischen Feldstudien beobachtet worden war,konnte hierbei bestätigt werden.Es konnte festgestellt werden,dass CDC nicht oder nur in sehr geringem Masse über ihr bakterielles Abbauprodukt LC hepatotoxisch wirkte,da auf Grund des Versuchsaufbaus der vorliegenden Arbeit die Bildung von LC mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden konnte.In der Therapie von Cholesteringallensteinen sollte deshalb UDC statt CDC Verwendung finden,da UDC in gleicher Konzentration wie CDC wirksam ist und erheblich geringere Membranschäden an Hepatozyten hervorruft.

Die in der Literatur beschriebene stark membrantoxische Wirkung von DC an intakten Zellen und Zellsystemen (perfundierte Leber) bestätigte sich,ebenso die schwächere Wirkung der konjugierten Gallensäure TC.

Die verwendeten Gallensäuren zerfielen in zwei Gruppen, die sich signifikant voneinander unterschieden:die stark schädigenden Gallensäuren DC und CDC und die relativ schwach wirksamen Gallensäuren UDC und TC.Die schädigende Wirkung der Gallensäuren dürfte in erster Linie auf ihren Wechselwirkungen mit hydrophoben Bestandteilen (Lipiden) der Zellmembran zurückzuführen sein,was sekundär als Folge der Aufhebung der Kompartimentierung des Zellstoffwechsels zu Störungen des Zellstoffwechsels führen wird.

Die Abstufung in der schädigenden Wirkung der Gallensäuren entspricht der Abstufung ihrer Hydrophobizität (DC>CDC > UDC>TC).

8. TABELLARISCHER ANHANG

Tabellen zur Umrechnung der Gallensäurekonzentrationen von g/l in mM/l.

Tab.5: Desoxycholsäure-Na_4-Salz MG = 415

0,1	g/l =	0,24 mM/l
0,25		0,60
0,5		1,21
1,0		2,41
2,5		6,03
5,0		12,05
10,0		24,10

1000µM/l = 0,42 g/l

Tab.6: Chenodesoxycholsäure und Ursodesoxycholsäure MG = 393

0,1	g/l =	0,26 mM/l
0,25		0,64
0,5		1,27
1,0		2,55
2,5		6,36
5,0		12,72
10,0		25,45

1000µM/l = 0,39 g/l

Tab.7: Taurocholsäure MG = 538

0,1	g/l =	0,19 mM/l
0,25		0,47
0,5		0,93
1,0		1,86
2,5		4,65
5,0		9,29
10,0		18,59

1000µM/l = 0,54 g/l

Tab.8: Dehydrocholsäure MG = 388

0,1	g/l =	0,26 mM/l
0,25		0,64
0,5		1,29
1,0		2,58
2,5		6,44
5,0		12,89
10,0		25,77

1000µM/l = 0,39 g/l

Tab.9: Hepatozyteninkubation mit CDC,Messung der Aktivität von LDH-1 und GOT im Überstand,Aktivität in mU/mg Protein +/- SEM,t=15',t=30' (n=2)

GOT

Konz.(µM/l)	t=15'	t=30'
Kontrolle	11 +/- 0	14 +/- 1
125	17 +/- 2	25 +/- 3
250	15 +/- 1	33 +/- 6
500	83 +/- 15	160 +/- 10
1000	616 +/- 10	968 +/- 182
1500	1071 +/- 7	1167 +/- 101

LDH-1

Konz.(µM/l)	t=15'	t=30'
Kontrolle	19 +/- 0	21 +/- 1
125	27 +/- 0	33 +/- 1
250	29 +/- 6	41 +/- 7
500	33 +/- 8	96 +/- 9
1000	230 +/- 7	351 +/- 53
1500	418 +/- 18	436 +/- 15

Tab.10: Hepatozyteninkubation mit DC,Messung der Aktivität von LDH-1 und GOT im Überstand,Aktivität in mU/mg Protein +/- SEM,t=15',t=30' (n=2)

GOT

Konz.(µM/l)	t=15'	t=30'
Kontrolle	6 +/- 1	8 +/- 1
125	8 +/- 1	10 +/- 2
250	11 +/- 0	12 +/- 1
500	16 +/- 2	25 +/- 7
1000	238 +/- 55	466 +/- 79
1500	1001 +/- 15	1295 +/- 33

LDH-1

Konz.(µM/l)	t=15'	t=30'
Kontrolle	6 +/- 3	7 +/- 2
125	7 +/- 2	12 +/- 4
250	16 +/- 2	10 +/- 2
500	11 +/- 3	6 +/- 2
1000	82 +/- 12	191 +/- 41
1500	396 +/- 24	511 +/- 16

Tab.11: Leberperfusion mit DC, Messung der Aktivität von LDH-1 und GOT im Perfusionsmedium, Aktivität in U/l +/- SEM, t=5', t=15' (n=2)

LDH-1

Konz.(µM/l)	t=5'	t=15'
Kontrolle	-	0 +/- 0
250	0 +/- 0	0 +/- 0
500	0 +/- 0	0 +/- 0
1000	13 +/- 8	154 +/- 31
1500	597 +/- 179	1637 +/- 357
2000	1907 +/- 304	2215 +/- 522
3000	2276 +/- 392	2338 +/- 522

GOT

Konz.(µM/l)	t=5'	t=15'
Kontrolle	-	5 +/- 1
250	5 +/- 1	7 +/- 1
500	7 +/- 1	9 +/- 1
1000	22 +/- 2	203 +/- 81
1500	732 +/- 308	2069 +/- 677
2000	2514 +/- 736	2778 +/- 864
3000	2750 +/- 923	2972 +/- 1002

Tab.12: Leberperfusion mit CDC, Messung der Aktivität von LDH-1 und GOT im Perfusionsmedium, Aktivität in U/l +/- SEM, t=5', t=15' (n=3)

LDH-1

Konz.(µM/l)	t=5'	t=15'
Kontrolle	-	0 +/- 0
250	0 +/- 0	9 +/- 2
500	0 +/- 0	0 +/- 0
1000	38 +/- 8	345 +/- 70
1500	1150 +/- 266	2111 +/- 422
2000	2037 +/- 300	3371 +/- 400
3000	3691 +/- 174	3876 +/- 43

GOT

Konz.(µM/l)	t=5'	t=15'
Kontrolle	-	2 +/- 1
250	7 +/- 0	7 +/- 0
500	10 +/- 0	15 +/- 2
1000	77 +/- 16	505 +/- 115
1500	1924 +/- 446	3267 +/- 676
2000	4250 +/- 766	6326 +/- 869
3000	5722 +/- 511	6194 +/- 491

Tab.13: Leberperfusion mit UDC, Messung der Aktivität von LDH-1 und GOT im Perfusionsmedium, Aktivität in U/l +/- SEM, t=5', t=15' (n=2)

LDH-1

Konz.(µM/l)	t=5'	t=15'
Kontrolle	-	0 +/- 0
250	0 +/- 0	0 +/- 0
500	13 +/- 9	14 +/- 10
1000	15 +/- 9	29 +/- 14
1500	30 +/- 13	40 +/- 6
2000	79 +/- 12	163 +/- 68
3000	217 +/- 91	287 +/- 85

GOT

Konz.(µM/l)	t=5'	t=15'
Kontrolle	-	6 +/- 4
250	8 +/- 2	9 +/- 2
500	10 +/- 3	12 +/- 4
1000	15 +/- 2	21 +/- 3
1500	28 +/- 1	40 +/- 4
2000	93 +/- 35	317 +/- 137
3000	420 +/- 175	629 +/- 184

Tab.14: Leberperfusion mit TC, Messung der Aktivität von LDH-1 und GOT im Perfusionsmedium, Aktivität in U/l +/- SEM, t=5', t=15' (n=2)

LDH-1

Konz.(µM/l)	t=5'	t=15'
Kontrolle	-	0 +/- 0
250	0 +/- 0	3 +/- 2
500	3 +/- 2	6 +/- 4
1000	5 +/- 1	8 +/- 3
1500	8 +/- 3	12 +/- 5
2000	14 +/- 5	47 +/- 24
2500	60 +/- 23	116 +/- 32
3000	160 +/- 4	269 +/- 10

GOT

Konz.(µM/l)	t=5'	t=15'
Kontrolle	-	2 +/- 1
250	3 +/- 2	9 +/- 2
500	12 +/- 4	16 +/-6
1000	18 +/- 5	24 +/- 9
1500	27 +/- 9	37 +/- 14
2000	75 +/- 38	100 +/- 47
2500	130 +/- 56	294 +/- 117
3000	328 +/- 82	631 +/- 143

Tab.15: Leberperfusion ohne Gallensäuren, Aktivität in U/l im Perfusionsmedium. (Einzelversuch)

t	LDH-1	GOT
5′	1 U/l	6 U/l
15′	1	6
30′	1	8
45′	1	7
60′	3	11
75′	5	17
90′	8	17
105′	8	22

9. LITERATURVERZEICHNIS

1. BARBARA,L., E. RODA and A. RODA:
The medical treatment of cholesterol gallstones , experience with chenodeoxycholic acid.
Digestion 14, 209-219 (1976)

2. BARNABEI,O., G. LEGHISSA and V. THOMASI:
Hormonal control of the potassium level in isolated rat liver cells.
Biochim. Biophys. Acta 362, 316-325 (1974)

3. BAUR,H., S. KASREREK and E. PFAFF:
Criteria of variability of isolated liver cells.
Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem. 356 827-838 (1975)

4. BELL,G.D., B. WHITNEY and R.H. DOWLING:
Gallstone dissolution in man using chenodeoxycholic acid.
Lancet 1972 II, 1213-1216

5. BERLINER,F. and R. SCHOENHEIMER:
Hemolytic and antihemolytic properties of bile acids and sterols in relation to their structure.
J. Biol. Chem. 124, 525-541 (1938)

6. BIAVA,C.: Studies on cholestasis.The fine structure and morphogenesis of hepatocellular and canalicular bile pigment.
Lab. Invest. 13, 1099-1104 (1964)

7. BRUCHELT,G.: Untersuchungen über den Einfluss von Verbrennungstoxinen auf den Stoffwechsel isolierter Hepatozyten und Mitochondrien der Ratte.
Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie,Tübingen (19807

8. CAREY,M.C. and D.M. SMALL:
Micelle formation by bile salts. Physical - chemical and thermodynamic considerations.
Arch. Intern. Med. 130, 506-525 (1972)

9. CAREY,M.C. and A.P. KORETSKY:
Self - association of unconjugated bilirubin-IX-α in aqueous solution at pH 10.0 and physical - chemical interactions with bile salt monomers and micelles.
Biochem. J. 179, 675-689 (1979)

10. COLEMAN,R., G. HOLDSWORTH and O.S. VYVODA:
Effekts of different bile salts upon the composition and morphology of a liver plasma membran preparation.Deoxycholate is more membran damaging than cholate and its conjugates.
Biochim. Biophys. Acta 465, 68-76 (1977)

11. CRANE,L.J. and D.L. MILLER:
Plasma protein synthesis by isolated rat hepatocytes.
J. Cell. Biol. 72, 11-25 (1977)

12. DANZIGER,R.G.,A.F. HOFMANN and L.S. SCHOENFIELD:
Dissolution of cholesterol gallstones by chenodeoxycholic acid.
N. Engl. J. Med. 286, 1-8 (1972)

13. DE BROE,M.E.,M. BORGERS and R.J. WIEME:
The separation and characterication of liver plasma membran frament circulating in the blood of patients with cholestasis.
Clin. Acta 59, 369-379 (1975)

14. DELIEU,T. and D.A. WALKER:
An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts.
New Phytol. 71, 201-225 (1972)

15. DESMET,V.J.: Morphologic and histochemical aspects of cholestasis.
in: Popper,H. and F. Schaffner:Progress in liver diseases,Vol. 4,97-99,New York: Grune and Stratton 1972

16. DIETSCHY,J.M.: Symposium on bile acids.
Arch. Intern. Med. 130, 473-648 (1972)

17. DREW,R. and B.G. PRIESTLY:
Failure of hypoactive hypertrophic smooth endoplasmatic reticulum to produce cholestasis in rats.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 45, 191-199 (1978)

18. DREWS,G.: Mikrobiologisches Praktikum für Naturwissenschaftler, 110-111
Berlin,Heidelberg,New York:
Springer 1968

19. EHRHARD,J.C. and J. CHAUVEAU:
Differential solubilization of proteins,phospholipids,free and esterified cholesterol of rat liver cellular membranes by sodium deoxycholate.
Biochim. Biophys. Acta 375, 434-445 (1975)

20. FEDOROWSKI,T., G. SALEN,F.G. ZAKI,S. SHEFER and E.H. MOSBACH:
Comparative effects of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid in the rhesus monkey.
Gastroenterology 74, 75-81 (1978)

21. FISHER,M.M., R. MAGNUSSEN and K. MIYAI:
Bile acid metabolism in mammals.
I. Bile acid - induced intrahepatic cholestasis.
Lab. Invest. 21, 88-91 (1971)

22. GADACZ,T.R., R.N. ALLAN and E. MACH:
Impaired lithocholate sulfation in the rhesus monkey:A mechanism for chenodeoxycholate toxicity.
Gastroenterology 70, 1125-1129 (1976)

23. GALLOP,P.M., S. SEIFTER and E. MEILMAN:
Studies on collagen II. Properties of purified collagenase and its inhibition.
J. Biol. Chem. 234, 285-293 (1959)

24. GONZALEZ,M.C., E. SUTHERLAND and F.R. SIMON:
Regulation of hepatic transport of bile salts.Effect of protein synthesis inhibition on excretion of bile salts and their binding to liver surface membran fractions.
J. Clin. Invest. 63, 684-694 (1979)

25. HANSEN,R.F., G.C. WILLIAMS and H.L. SHARP:
Hepatic lesions and hemolysis following administration of 3α-7α-12α-trihydroxy-5ß-cholestan-26 oxyl-taurine to rats.
J. Lab. Clin. Med. 90, 536-548 (1977)

26. HARTLEY,G.S.: Aqueous solution of paraffin-chain salts.A study in micelle formation.
in:Actualités Scientifiques et Industrielles
Paris: Hermann & Cie 1936

27. HOENIG,K.: Elimination fremder Verbindungen durch die Leber.
in: Kühn,H.A. und H. Wernze: Klinische Hepatologie,2.12-2.18
Stuttgart: Thieme 1979

28. HOFMANN,A.F.: The enterohepatic circulation of bile acids in man.
in: Stollerman,G.H.: Adv. Intern. Med.
Chicago: Year Bk. Med. 1975

29. HOFMANN,A.F.: Störungen des Gallensäurestoffwechsels
in: Kühn,H.A. und H. Wernze: Klinische Hepatologie, 3.75-3.83,
Stuttgart: Thieme 1979

30. HOLSTI,P.: Experimental cirrhosis of the liver in rabbits induced by gastric instillation of desiccated whole bile.
Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl. 112, 1-67 (1956)

31. HOWARD,R.B., A.K. CHRISTENSEN,F.A. GIBBS and A. PESCH:
The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver.
J. Cells Biol. 35, 675-684 (1967)

32. HOWARD,R.B., and L.A. PESCH:
Respiratory activity of intact,isolated parenchymal cells from rat liver.
J. Biol. Chem. 243, 3105-3109 (1968)

33. HOPPE-SEYLER,F.: Physiologische Chemie,Bd. 2,275-324
Berlin: August Hirschwald Verlag 1877

34. ISER,J.H., R.H. DOWLING and H.Y.J. MOK:
Chenodeoxycholic acid treatment of gallstones: a follow up report and analysis of factors influencing response to therapy.
N. Engl. J. Med. 293, 378-383 (1975)

35. JAKOB,S.T. and P.M. BHARGAVA:
A new method for the preparation of liver cells suspensions.
Exp. Cell. Res. 27, 453-467 (1962)

36. KAKIS,G. and I.M. YOUSEF:
Pathogenesis of lithocholate- and taurolithocholate-induced intrahepatic cholestasis in rats.
Gastroenterology 75, 595-607 (1978)

37. KÜHN,H.A. und WERNZE:
Physiologie und Pathologie der Gallensekretion.
in: Kühn,H.A. und H. Wernze: Klinische Hepatologie, 2.25-2.37
Stuttgart: Thieme 1979

38. KURTZ,W., P. JANKA,L. SWOBODA und U. LEUSCHNER:
Nichtsulfatierte Gallensäuren in der Leberzelle der Ratte.Untersuchungen zur Toxizität der Chenodesoxycholsäure.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 83, 496-499 (1978)

39. KUTZ,C. and A. SCHULTE:
Effectiveness of ursodeoxycholic acid in gallstone therapy. (letter)
Gastroenterology 73, 632-633 (1977)

40. LAYDEN,T.J. and J.L. BOYER:
Taurolithocholate- induced cholestasis: Taurocholate but not dehydrocholate reverses cholestasis and bile canaliculi membrane injury.
Gastroenterology 73, 120-128 (1977)

41. LEE,M.J. and M.W. WHITEHOUSE:
Inhibition of electron transport and coupled phosphorylation in liver mitochondria by cholanic (bile) acids and their conjugates.
Biochem. Biophys. Acta 100,317-328 (1965)

42. LEESON,T.S. and H. KALANT:
Effects of in vitro decalcification on ultrastructure of adult rat liver.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 10, 95-104 (1961)

43. LEUSCHNER,U., L. SWOBODA,W. KURTZ und P. JANKA:
Nichtsulfatierte Gallensäuren in der Leberzelle der Ratte.Untersuchungen zur Toxizität der Chenodesoxycholsäure.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 83, 496-499 (1978)

44. LEUSCHNER,U., M. SCHNEIDER und L. KORTE:
Der Einfluss von Chenodesoxycholsäure und Ursodesoxycholsäure auf die Leberstruktur der Ratte.
Z. Gastroenterologie 17, 244-256 (1979)

45. LIERSCH,M. und W. HESSE:
Untersuchungen zum Stoffwechsel der Leber während der Cholestase.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 80, 429-432 (1975)

46. LOWRY,O.H., N.J. ROSEBROUGH,A.L. FARR and R.J. RANDELL:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

47. MAKINO,J., S. NAKAGAWA and K. MASHIMO:
Conjugated and unconjugated serum bile acid levels in patients with hepatobiliary diseases.
Gastroenterology 56, 1033-1039 (1969)

48. MAKINO,S., C. TANFORD and J.A. REYNOLDS:
The binding of deoxycholate and triton X-100 to proteins
J. Biol. Chem. 248, 4926-4932 (1973)

49. MAKINO,J., K. SHINOZAKI and K. YOSHINO:
Dissolution of cholesterol gallstones by ursodeoxycholic acid.
Jpn. J. Gastroenterol. 72, 690-691 (1975)

50. MATON,P.N. und R.H. DOWLING
in: V Bile acid meeting:
Biologische Effekte der Gallensäuren, 3. Arbeitssitzung,
Kongressbericht 26,Freiburg,Br.:
Dr. Falk 1978

51. MAZER,N.A., M.C. CAREY,R.F. KWASNICK and G.B. BENEDEK:
Quasielastic light scattering studies of aqueous biliary lipid systems. Size,shape and thermodynamics of bile salt micelles.
Biochemistry 18, 3064-3075 (1979)

52. MCBAIN,E.L. and E. HUTCHINSON:
Solubilization and related phenomena
New York:Academic Press 1955

53. MCBAIN,J.W. R.C. MERILL and J.R. VINOGRAD:
The solubilization of water - insoluble dye in solutions of aqueous detergents.
J. Amer. Chem. Soc. 63, 670-676 (1941)

54. MEIJER,D.K.F., R.J. VONK and J.G. WERTERING:
The influence of various bile salts and some cholephilic dyes on Na^+-,K^+- and Mg^{2+}- activated ATPase of rat liver in relation to cholestatic effects.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 43, 597-612

55. MIYAI,K., V.M. PRICE and M.M. FISHER:
Bile acid metabolism in mammals,ultrastructural studies on the intrahepatic cholestasis induced by lithocholic and chenodeoxycholic acid in the rat.
Lab. Invest. 24, 292-301 (1971)

56. MIYAI,K., A.L. RICHARDSON,W. MAYR and N.B. JAVITT:
Subcellular pathology of rat liver in cholestasis and choleresis induced by bile salts.1. Effects of lithocholic, 3-ß-hydroxy-5-cholenic,cholic and dehydrocholic acids.
Lab. Invest. 36, 249-258 (1977)

57. MODJANOVA,E.A. and A.G. MALENKOV:
Alteration of properties of cell contacts during progression of hepatomas.
Exp. Cell. Res. 76, 305-314 (1973)

58. NAKAGAWA,S., I. MAKINO and T. ISHIZAKI:
Dissolution of cholesterol gallstones by ursodeoxycholic acid.
Lancet 1977 II, 367-369

59. PALMER,R.H.: Hemolytic effects of steroids
Nature 201, 1134-1135 (1964)

60. PALMER,R.H.: Bile acids,liver injury and liver disease.
Arch. Intern. Med. 130, 606-618 (1972)

61. POPPER,H. und F. SCHAFFNER:
Die Leber.Struktur und Funktion,87-92
Stuttgart: Thieme 1961

62. POPPER,H. and F. SCHAFFNER:
Pathophysiology of cholestasis.
Human Pathol. 1, 24-32

63. PREISIG,R., G. BAUMGARTNER and J. REICHEN:
Influence of chemical structure on hepatocellular uptake.
in: Falk Symposium Nr.24 1976

64. RODLOFF,C.: Vergleichende Untersuchung der Gallensäuren Chenodesoxycholsäure,Ursodesoxycholsäure,Desoxycholsäure,Taurocholsäure und Dehydrocholsäure bezüglich ihrer Wirkung auf die Zellenzyme LDH-1,LDH-5,GOT und GPT.
Vorgelegte Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin,medizinische Fakultät (klin. Med.) der Eberhard-Karls-Universität Tübingen,1981

65. POEPKE,R.R. and H.L. MASON:
Micelle formation in aqueous solutions of bile salts.
J. Biol. Chem. 133, 103-108 (1940)

66. SAVIOLI,G., R. LUGLI and R. SALATI:
Changes induced by ursodeoxycholic acid on the lipid composition of bile and plasma subjects with cholesterol gallstones.Cholelitholytic effect (abstr.)
Digestion 16, 345 (1977)

67. SCHMID,M.: Leber
in: Siegenthaler,W.: Klinische Pathophysiologie, 3. Aufl., 793-826
Stuttgart: Thieme 1976

68. SCHMIDT,E. und F.W. SCHMIDT:
Kleine Enzym-Fibel,
Schriftenreihe: Diagnostika Boehringer, Mannheim 1974

69. SCHMIDT,F.W. und E. SCHMIDT:
Grundlagen der enzymatischen Analyse
in: Bergmeyer,H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse
5.Aufl.,Band I,11-32
Weinheim/Bergstr.: Verlag Chemie 1970

70. SCHMIDT,F.W. und U. BÄR:
Enzymdiagnostik: Grundlagen und Anwendung
in: Kühn,H.A. und H. Wernze: Klinische Hepatologie, 3.95-3.105
Stuttgart: Thieme 1976

71. SCHWARZ,L.R., R. BURR,M. SCHWENK,E. PFAFF und H. GREIM:
Uptake of taurolithocholate acid by liver cells.
Eur. J. Biochem. 55, 617-621 1975

72. SCHWENK,M., L.R. SCHWARZ and H. GREIM:
Taurolithocholate inhibits taurocholate uptake by isolated hepatocytes at low concentrations
Naunyn - Schmiedberg's Arch. Pharmacol. 298, 175-179 (1977)

73. SEGLEN,P.O.: Preparation of rat liver cells.
II. Effects of ions and chelators on tissue dispersion
Exp. Cell. Res. 76, 25-30 (1973)

74. SEGLEN,P.O.: Preparation of rat liver cells.
III. Enzymatic requirements for tissue dispersion
Exp. Cell. Res. 82, 391-398 (1973)

75. SMALL,D.M.: Molecular association in biological and related systems.
American Chemical Society Symposium 1967, Florida
Adv. Chem. Ser. 84, 31-52 (1968)

76. SMALL,D.M. and W.H. ADMIRAND:
Solubility of bile salts
Nature 221, 265-267 (1969)

77. SMALL,D.M., S.A. PENKETT and D. CHAPMAN:
Studies on simple and mixed bile salt micelles by nuclear magnetic resonance spectroscopy.
Biochim. Biophys. Acta 173, 178-189 (1969)

78. STIEHL,A., P. CZYGAN and B. KOMMERELL:
Ursodeoxycholic acid versus chenodeoxycholic acid: a comparison of their effects on bile acids and cholesterol saturation in bile of patients with cholesterol gallstones (abstr.)
Digestion 16, 323-324 (1977)

79. STIEHL,A., P. CZYGAN,B. KOMMERELL,H.J. WEIS and K.H. HOLTERMÜLLER:
Ursodeoxycholic acid versus chenodeoxycholic acid.Comparison of their effects on bile and bile lipid composition in patients with cholesterol gallstones.
Gastroenterology 75, 1016-1020 (1978)

80. STIEHL,A.P., P. CZYGAN,B. KOMMERELL,H.J. WEIS und K.H. HOLTERMÜLLER:
in: V Bile acid meeting:
Biologische Effekte der Gallensäuren, 2. Arbeitssitzung
Kongressbericht 26,Freiburg,Br.:
Dr. Falk 1978

81. STRANGE,R.C., G.J. BECKETT and J.W. PERCY-ROBB:
Nuclear and cytosolic distribution of conjugated cholic acid and radiolabelled glycocholic acid in rat liver.
Biochem. J. 178, 71-78 (1979)

82. TANFORD,C.: The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes 2. Aufl., New York:Wiley 1980

83. THISTLE,J.L. and A.F. HOFMANN: Efficacy and specificity of chenodeoxycholic acid therapy for dissolving gallstones. N. Engl. J. Med. 289, 655-659 (1973)

84. WAGLE,S.R. and W.R. INGEBRETSEN: Isolation,purification and charcteristics of rat liver hepatocytes Methods in Enzymology 35, Part B, 579-594 (1975)

85. WEIS,H.J.: Nebenwirkungen von CDC und UDC in: V Bile acid meeting: Biologische Effekte der Gallensäuren, Kongressbericht 26,Freiburg,Br.: Dr. Falk 1978

86. WIELAND,H. und M. SORGE: Untersuchungen über Gallensäuren II. Mitteilung.Zur Kenntnis der Choleinsäure. Hoppe - Seylers Z. Physiol. Chem. 97, 1-27 (1916)

Lebenslauf

Ich, Tobias Rogg, wurde am 24.12.1955 in Ulm als Sohn von Wilhelm Rogg, kaufmännischer Angestellter, und seiner Frau Elfriede, geb. Kieninger, geboren.
Von 1961 bis 1966 besuchte ich in Nürnberg die Grundschule und die 1. Klasse des Gymnasiums.
Von 1967 bis 1975 besuchte ich bis zum Abitur das Kepler-Gymnasium in Ulm.
Nach Ableistung von 9 Monaten Grundwehrdienst bei der Luftlandetruppe in Calw und Nagold nahm ich im Sommersemester 1976 das Medizinstudium in Tübingen auf.
Meine Doktorarbeit fertigte ich bei Priv.-Doz. Dr.Dr. K. Schmidt,Labor der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen,an.
Am 5. Oktober 1982 legte ich den schriftlichen und am 22. Oktober den mündlichen Teil des 3. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung ab.